

Alma Mater Studiorum
Università degli Studi di Bologna

Dottorato di ricerca in Oncologia e Patologia Sperimentale
Ciclo XXI

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Sandro Grilli

FOCALITA' E CLONALITA' NEI CARCINOMI
IN SITU ED INVASIVO MAMMARI, STUDIO
GENETICO E NUOVE TECNICHE DI
RADIOTERAPIA

Relatore:

Dott.ssa Antonella Baldissera

Tutor:

Chiar.mo Prof. Vincenzo Eusebi

Esame finale Anno 2008

INDICE

1.0	INTRODUZIONE	<i>pag.</i> 3
1.1	<i>Embriologia e anatomia della ghiandola mammaria</i>	3
1.2	<i>Epidemiologia del carcinoma mammario</i>	5
1.3	<i>Fattori predisponenti</i>	5
1.4	<i>Aspetto radiografico</i>	7
1.5	<i>Classificazione</i>	8
1.6	<i>Carcinoma mammario maschile</i>	15
2.0	TERAPIA DEL CARCINOMA MAMMARIO	16
2.1	<i>Trattamento chirurgico</i>	16
2.2	<i>Radioterapia</i>	19
2.3	<i>Trattamento oncologico sistemico</i>	22
3.0	INNOVAZIONI	28
3.1	<i>Teoria del “lobo malato”</i>	28
3.2	<i>Nuove tecniche di radioterapia</i>	31
4.0	SCOPO DELLA TESI	37
5.0	MATERIALI E METODI	38
5.1	<i>Macrosezioni</i>	38
5.2	<i>DNA mitocondriale</i>	41
5.3	<i>GCH</i>	44
6.0	RISULTATI	47
7.0	DISCUSSIONE	55
8.0.	CONCLUSIONE	59
	<i>Bibliografia</i>	61

1.0 INTRODUZIONE

1.1 Embriologia e anatomia della ghiandola mammaria

Lo sviluppo della ghiandola mammaria inizia nell'embrione di 5 settimane, dalla cosiddetta "linea del latte", un ispessimento che si estende bilateralmente dall'ascella fino alla parte supero-mediale della coscia.

La maggior parte degli abbozzi mammari regredisce, restando solo un'abbozzo mammario a livello toracico che diventerà la ghiandola mammaria.

Alla 15ma settimana di gestazione, il mesenchima si addensa attorno ai primi nidi epiteliali per differenziarsi, tra la 20ma e 32ma settimana, in tessuto adiposo e nel tessuto fibroso che forma il legamento di Cooper. Il legamento di Cooper garantisce l'aderenza della ghiandola mammaria alla parete toracica. La componente epiteliale si canalizza e forma i dotti.

I dotti convergono verso una plica epidermica dalla quale origina il capezzolo che completa il suo sviluppo alla nascita.

Sino alla 15ma settimana di gestazione, lo sviluppo della ghiandola mammaria è indipendente da stimolazione ormonale. Dopo la 15ma settimana, l'abbozzo mammario risente della stimolazione con testosterone e negli ultimi due mesi di gestazione risente degli ormoni materni che possono indurre un'attività secretoria anche nella ghiandola fetale.

Lo sviluppo mammario riprende alla pubertà, parallelamente alla comparsa del menarca. Sotto lo stimolo di estrogeni, progesterone e ormone della crescita i dotti si allungano e si sviluppano gli acini. Normalmente, lo sviluppo della ghiandola mammaria si completa in epoca adolescenziale, ma in alcuni casi ritarda al 20mo anno di vita.

Anatomia della ghiandola mammaria

La ghiandola mammaria della donna adulta contiene mediamente 27 unità funzionali, i lobi ⁽¹²⁾. Ciascun lobo è drenato da un dotto galattoforo che sbocca nel capezzolo. Immediatamente prima di aprirsi nel capezzolo, i dotti galattofori si dilatano nel "seno lattifero". Dal capezzolo verso il parenchima mammario, i dotti galattofori si diramano in dotti di calibro minore, i dotti

segmentari e i dotti subsegmentari. Infine si giunge all' unità funzionale e secernente, l'Unità terminale duttulo-lobulare (TDLU)⁽¹⁾. La TDLU è composta da un duttulo e dagli acini connessi a questo. La componente ghiandolare della mammella è immersa in un abbondante stroma fibroso e adiposo e il lobulo mammario è l'unità funzionale composta dagli acini e dallo stroma che li contiene.

Il capezzolo è rivestito da epidermide e differisce dalla restante cute per il numero elevato di melanociti basali e per le cellule di Toker. Le cellule di Toker circondano gli osti dei seni galattofori, hanno localizzazione sovrabasale e hanno origine dall'epitelio dei dotti ^(2,88).

Sull' areola sono visibili piccole protuberanze, i tubercoli di Morgagni/Montgomeri.

I dotti galattofori, nel tratto più vicino allo sbocco sul capezzolo, sono rivestiti da epitelio squamoso pluristratificato. Questo, a livello del seno galattoforo, gradualmente lascia il posto all'epitelio cilindrico bistratificato che riveste la ghiandola mammaria. Dotti e acini mammari sono rivestiti da due strati di cellule: uno interno di cellule epiteliali/secretorie e uno esterno di cellule mioepiteliali.

I dotti sono circondati da uno strato di fibre elastiche che s'interrompe a livello delle diramazioni di minore calibro e non compare attorno alle strutture della TDLU. Queste sono circondate da uno stroma delicato di fibre collagene, contenente piccoli vasi capillari e strutture vascolari prelinfatiche note come "spazi di Hartveit"^(3,78,88).

Il drenaggio delle vie linfatiche è molto complesso a livello mammario poiché vi è una sovrapposizione fra il plesso linfatico subepiteliale della cute e il drenaggio linfatico dal parenchima mammario.

Non è chiaro se i due sistemi confluiscono in un unico sistema di deflusso. Nel parenchima mammario i linfatici defluiscono lungo lo stroma specializzato, convergono nel plesso retroareolare e quindi confluiscono nei linfonodi regionali. Circa il 90% di tutta la linfa confluisce nei linfonodi ascellari mentre il resto giunge in sedi extra-ascellari quali i linfonodi della catena mammaria interna.

Nella pratica clinica i linfonodi ascellari sono suddivisi in apicali o sottoclaveari (mediali al muscolo pettorale), mammari esterni (nella parte

laterale del muscolo pettorale maggiore), linfonodi scapolari (vicini ai vasi sottoscapolari) e infine il gruppo dei linfonodi centrali (al centro dell'ascella). Il linfonodo di Rotter e' costituito da un sistema di 1-4 linfonodi tra i muscoli pettorali maggiore e minore.

1.2 Epidemiologia del carcinoma mammario

Il carcinoma mammario è la neoplasia maligna che più frequentemente conduce a morte nel sesso femminile e costituisce il 30% delle neoplasie ⁽⁴⁾. Le stime d'incidenza, basate sulle statistiche di mortalità e di sopravvivenza e sui dati dei registri tumori mostrano negli ultimi anni un incremento del numero di nuovi casi di carcinoma mammario (circa 35.0000). I tassi di incidenza standardizzati per età sono del 30-35% più elevati al Nord che nel Sud. Le differenze geografiche si stanno però riducendo e sono praticamente confinate all'età superiore a 50 anni, nelle giovani donne l'incidenza è assai simile in tutta Italia

Nel sesso maschile è più raro, solo l'1% delle neoplasie maligne.

Recentemente si è assistito ad un incremento di incidenza del carcinoma mammario, probabilmente causato dall' introduzione di programmi di screening che consentono la diagnosi di neoplasie di piccole dimensioni e forse anche di neoplasie che resterebbero silenti analogamente a quanto accade nei carcinomi . La mortalità del carcinoma mammario è rimasta sostanzialmente invariata dal 1930 al 1990. Nell' ultimo decennio la mortalità sembra leggermente ridotta, forse grazie alla possibilità di diagnosi precoce e delle terapie combinate su base ormonale.

1.3 Fattori Predisponenti

Fattori geografici: l'incidenza del carcinoma mammario ha una grande variabilità regionale. E' estremamente frequente nei paesi industrializzati, quali Stati Uniti, Europa Occidentale e Australia, dove circa il 6% della

popolazione femminile sviluppa un carcinoma mammario entro il 75mo anno di età. Al contrario, è molto più raro nei paesi non industrializzati⁽⁵⁾. Il Giappone è l'unico paese industrializzato con una bassa incidenza di carcinoma mammario.

Fattori mestruali e riproduttivi: il carcinoma mammario è più frequente in donne con menarca precoce, nullipare o con prima gravidanza in età superiore ai 30 anni.

Fattori familiari: la presenza di un parente di primo grado (madre o sorella) con carcinoma mammario rende doppio il rischio di sviluppare il carcinoma mammario rispetto alla popolazione generale. Il rischio è maggiore se entrambe, madre e sorella, hanno avuto il carcinoma mammario. Nelle pazienti con familiarità, il carcinoma mammario compare in età giovanile (prima dei 40 anni) ed è più frequentemente bilaterale⁽⁶⁾.

Predisposizione genetica: recentemente sono stati identificati due geni che, nelle persone affette da mutazioni germinali, determinano un aumento del rischio di sviluppare carcinoma mammario. Si tratta dei geni BRCA1 e BRCA2, (BReast CAncer) localizzati l'uno sul cromosoma 17q e l'altro sul cromosoma 12q-12-13. Nelle persone con mutazione germinale di BRCA1 e BRCA2 la probabilità di sviluppare il carcinoma mammario prima dei 70 anni è del 56% circa. Il rischio è pertanto molto superiore a quello della popolazione generale, tuttavia non fornisce la certezza che la neoplasia compaia⁽⁷⁾.

Contraccettivi orali: la maggior parte degli studi recenti ha evidenziato solo un modesto aumento di rischi in donne giovani con assunzione di contraccettivi orali da lunga durata.

Terapia ormonale sostitutiva in post-menopausa: il rischio di sviluppare il carcinoma mammario è modico (2,3%) in persone che assumono terapia ormonale sostitutiva per un periodo inferiore a 5 anni. Il rischio sembra elevarsi per trattamenti di durata superiore ai 5 anni, tuttavia i dati al riguardo sono ancora incompleti.

Fattori nutrizionali: il consumo di frutta e vegetali freschi sembra avere un ruolo protettivo, mentre l'elevato consumo di carni, soprattutto rosse, sembra favorire lo sviluppo del carcinoma. Tuttavia si tratta di studi non confermati e

che non valutano la possibile influenza di eventuali contaminanti, tipo di cottura, ecc.

Alcool: l'elevato consumo di bevande alcoliche è stato associato ad un modesto incremento del rischio, soprattutto se associato ad altri fattori, familiari o genetici (5).

Obesità: secondo uno studio recente, donne in post- menopausa con un BMI superiore ai 25 kg/mq hanno un rischio del 40% circa di sviluppare il carcinoma mammario ⁽⁸⁾.

Attività fisica: l'attività fisica determina una riduzione del carcinoma mammario del 20-40% indipendentemente dal fatto che si tratti di donne in età fertile o in post-menopausa.

1.4 Aspetto radiografico

La mammografia permette di diagnosticare noduli mammari di dimensioni inferiori al centimetro e quindi non palpabili. E' efficace prevalentemente nelle lesioni che calcificano (sono visibili calcificazioni superiori a 150 micron) e in quelle che causano distorsione della struttura mammaria. La mammografia è un' indagine utile soprattutto in donne di età superiore ai 35 anni, prima infatti le caratteristiche fisiologiche del tessuto mammario rendono difficoltosa l' interpretazione della struttura mammaria poiché il tessuto fibroso è dominante, mascherando le lesioni delle ghiandole.

L'introduzione di programmi di screening mammografico ha accentuato la frequenza della diagnosi di neoplasie invasive di piccole dimensioni e di carcinomi in situ. L'aspetto mammografico del carcinoma mammario è estremamente variabile. Uno studio effettuato correlando l'aspetto mammografico ed istologico di 866 carcinomi mammari ⁽⁹⁾ ha evidenziato tre aspetti più frequenti:

- 1- Nella maggior parte dei casi (64%) il carcinoma mammario appare come addensamento rotondeggiante o stellariforme,
- 2-nel 17% circa dei casi a tale aspetto si associano microcalcificazioni,
- 3-nel 20% dei casi si osservano solo microcalcificazioni.

Da questi dati si rileva che la mammografia riesce a diagnosticare lesioni che provocano un addensamento nel tessuto mammario oppure che determinano microcalcificazioni. Al contrario le neoplasie che non calcificano o che non

determinano addensamenti nel tessuto mammario, quali il carcinoma lobulare sia in situ che infiltrante, possono sfuggire all' esame mammografico.

Microcalcificazioni e carcinoma duttale in situ (CDIS) – correlazione patologico/mammografica

La maggioranza dei CDIS (circa il 60%) è documentata mammograficamente da significative microcalcificazioni. Il loro aspetto, mammografico e istologico, è piuttosto caratteristico per i differenti tipi di CDIS ⁽⁸¹⁾.

CDIS poco differenziato: Microcalcificazioni associate a CDIS poco differenziati appaiono alla mammografia grossolane, lineari e spesso ramificate o granulari. Le stesse corrispondono a calcificazioni granulari all'esame istologico.

CDIS ben differenziato: Microcalcificazioni associate a CDIS ben differenziati appaiono alla mammografia come gruppi multipli di fini microcalcificazioni che corrispondono a gruppi di calcificazioni lamellari (psammomatose) all'esame istologico.

Basandosi sull'estensione delle microcalcificazioni, la mammografia sottostima solitamente le dimensioni del CDIS, pur se recenti studi dimostrano una discordanza inferiore ai 2 cm nell' 80-85% dei casi ⁽¹⁰⁾.

1.5 Classificazione

La classificazione del carcinoma mammario è cambiata recentemente, poiché da criteri strutturali che non avevano per nulla correlazioni cliniche, si è passati a classificazioni citoarchitetture che non solo hanno correlazioni con i vari marcatori prognostici e predittivi, ma hanno anche valenza prognostica ^(77,81,82). In questa tesi si farà riferimento alla classificazione OMS 2003 ⁽⁵⁾, che è la versione modificata della classificazione di Holland et al ⁽⁸¹⁾.

Carcinoma in situ

Il carcinoma in situ è una neoplasia confinata alla struttura nella quale insorge. Poiché non viene a contatto con i vasi, il carcinoma in situ non può metastatizzare.

La maggior parte dei carcinomi mammari insorge nell'unità tubulo lobulare (TDLU)⁽¹⁾ e da lì le cellule neoplastiche diffondono sia verso i dotti che verso gli acini. Carcinoma duttale in situ e carcinoma lobulare in situ differiscono per architettura e citologia ma non per sede d'insorgenza, che è la stessa.

Carcinoma duttale in situ (CDIS) : il CDIS ha incidenza pari al 20% circa dei casi. Può presentarsi puro o associato a carcinoma invasivo. Il 60% circa dei CDIS è riconosciuto mammograficamente a seguito delle microcalcificazioni⁽¹¹⁾. Il CDIS è raramente visibile all'esame macroscopico. Le forme visibili in genere sono quelle poco differenziate. Il CDIS ben differenziato in genere non è visibile all'esame macroscopico.

La classificazione OMS⁽⁵⁾ distingue in tre tipi di CDIS:

CDIS ben differenziato: è composto da cellule monomorfe, di piccole dimensioni, nucleo ovalare con cromatina fine e nucleolo piccolo. Le cellule possono disporsi ad arco, micropapille, ghiandole, aspetti cribriformi o aree solide. Ci sono microcalcificazioni di tipo lamellare⁽¹¹⁾.

Studi tridimensionali hanno dimostrato che il CDIS di basso grado cresce all'interno del lobo mammario in modo non continuo, quindi con aree di dotto interessato alternate ad aree libere⁽¹²⁾. La distanza massima tra le aree interessate da neoplasia e le libere è generalmente inferiore a 1 cm. Questo dato è molto importante perché se la neoplasia dista almeno 1 cm dal margine di resezione chirurgico, le probabilità che la lesione sia curata e non recidivi sono maggiori⁽⁸⁷⁾.

CDIS moderatamente differenziato : con caratteristiche intermedie tra quelle del CDIS ben differenziato e del CDIS poco differenziato.

CDIS poco differenziato : è composto da cellule con marcato pleomorfismo e che perdono la polarizzazione, formando quindi strutture irregolari. Le cellule sono di ampie dimensioni, hanno nucleo con cromatina irregolare e nucleolo prominente. E' frequentemente presente necrosi. Possono essere presenti

microcalcificazioni granulari di fosfato di calcio che, mammograficamente, danno strutture granulari caratteristiche ⁽¹¹⁾.

Il CDIS ben differenziato se si associa a componente invasiva, questa è di tipo ben differenziato e la neoplasia raramente causa morte della paziente. Il CDIS poco differenziato che si associa a carcinoma invasivo poco differenziato, questo è di grado 3 e la lesione è aggressiva.

Carcinoma lobulare in situ/ Neoplasia Lobulare (CLIS/NL): nel 1941 Foote e Stewart ⁽¹³⁾ descrissero una proliferazione cellulare neoplastica che essi denominarono carcinoma lobulare in situ poichè ritennero che originasse esclusivamente nei lobuli. Tale neoplasia è costituita da elementi caratteristici, poco coesivi tra loro e negativi per caderina-e ⁽¹⁴⁾. La caderina-e è codificata dal gene CDH-1. La caderina-e è una molecola trans-membrana, fondamentale per la formazione del complesso inter-cellulare e per la polarità delle cellule epiteliali. Il dominio citoplasmatico della caderina-e interagisce con i filamenti di actina attraverso le catenine intracellulari. Il dominio extra-cellulare è impegnato nell'adesione intercellulare, probabilmente nella formazione di un complesso a cerniera. La perdita di questa molecola di adesione cellulare è una caratteristica peculiare che contraddistingue le cellule del CLIS/LN dalle altre proliferazioni epiteliali.

Il CLIS/NL ha cellule rotondeggianti, nuclei uniformi, nucleoli piccoli, citoplasma scarso.

Il CLIS/NL cresce negli acini ma può diffondere ai dotti e le cellule insinuarsi tra il mioepitelio e l'epitelio secretorio del lume. Questo tipo di crescita è definito come diffusione pagetoide ⁽¹⁵⁾.

Il CLIS/NL è una lesione clinicamente silente, non forma noduli palpabili e calcifica raramente.

Il CLIS/NL è frequentemente multicentrico nel 60-80% dei casi, interessando quadranti mammari diversi e può anche essere bilaterale (OMS 2003).

Non si sa con certezza se il CLIS/NL sia precursore di carcinoma invasivo o se costituisca solo un indicatore di rischio di sviluppare carcinoma invasivo.

Carcinoma invasivo

Carcinoma duttale invasivo non altrimenti specificato (CDI NAS): è la forma più frequente di carcinoma invasivo della mammella (80%).

Il CDI NAS si presenta come nodulo solido e di consistenza dura. Può contenere necrosi e aree pseudocistiche. Le dimensioni variano da pochi millimetri a diversi centimetri e costituiscono un fattore prognostico importante.

Il CDI NAS è composto da cellule atipiche disposte in cordoni solidi o strutture ghiandolari irregolari. Il citoplasma è più o meno abbondante, il nucleo centrale, il nucleolo prominente. I differenti tipi vengono gradati secondo Elston e Ellis. ⁽⁴⁾ Carcinoma lobulare infiltrante (CLI) : il CLI costituisce il 5 – 15 % dei carcinomi mammari.

Il CLI è palpabile come nodulo o come indurimento diffuso della mammella. Le dimensioni della neoplasia sono fattore prognostico importante.

Il ***CLI classico*** ha cellule piccole che hanno perso la caderina-e. Generalmente non c'è reazione stromale e per questo motivo la neoplasia non forma un vero e proprio nodulo, apprezzabile microscopicamente e mammograficamente.

Il ***CLI pleomorfo*** ha cellule con nucleo irregolare, talora binucleate e citoplasma ampio. Il comportamento clinico è più aggressivo e la prognosi peggiore rispetto al CLI classico ⁽¹⁶⁾.

Il restante 10% dei carcinomi invasivi vengono dette **forme speciali** perchè, anche se non esclusive della mammella, ne caratterizzano l'organo.

Fattori prognostici:

I fattori prognostici di maggiore importanza che hanno impatto sulla prognosi sono il **grado istologico e lo stadio della neoplasia alla presentazione.**

Grading: la determinazione del grado viene eseguita su sezioni istologiche ⁽¹⁷⁾ e si basa sulla valutazione della formazione di ghiandole (definite come strutture con lume centrale, delineate da cellule neoplastiche), del pleomorfismo nucleare (forma, dimensioni del nucleo e presenza del nucleolo) e del numero delle mitosi (la conta su 10 campi microscopici a forte ingrandimento). Il grado istologico è un fattore prognostico indipendente molto importante. I casi di basso grado (o ben differenziati) hanno un periodo

di sopravvivenza libero da malattia molto superiore rispetto ai casi di alto grado (o poco differenziati). Esistono vari tipi di sistemi di gradazione ma quello consigliato dalla OMS⁽⁵⁾ è quello di Elston e Ellis⁽⁷⁹⁾.

Staging: la stadiazione delle neoplasie mammarie fa riferimento al sistema TNM adottato dall' American Joint Committee on Cancer (AJCC) nel 2002⁽¹⁸⁾.

Tale sistema si basa sulle dimensioni della neoplasia (T), presenza ed estensione delle metastasi ai linfonodi regionali (N) e presenza di eventuali metastasi a distanza (M).

Tumore primitivo (T)

Tx= dimensioni del tumore primitivo non possono essere valutate

T0= non evidenza di neoplasia primitiva

T1s= carcinoma in situ

T1= neoplasia di dimensioni inferiori a 2cm

T2= neoplasia di dimensioni comprese tra 2 e 5cm di asse maggiore

T3= neoplasia di dimensioni superiori a 5cm

T4= neoplasia di qualsiasi dimensione che infiltri la parete toracica o la cute

Linfonodi regionali (N)

Nx= linfonodi non valutabili

N0= assenza di metastasi linfonodali

Nmi1= Micrometastasi di dimensioni comprese tra 0,2 e 2mm di asse maggiore

N1= metastasi in 1-3 linfonodi ascellari

N2= metastasi in 4-9 linfonodi ascellari

N3= metastasi in oltre 10 linfonodi ascellari oppure a linfonodi

sovracaveari

Metastasi a distanza (M)

Mx= metastasi non valutabili

M0= metastasi assenti

M1= presenza di metastasi a distanza

Lo stato linfonodale è considerato uno dei fattori prognostici di maggiore importanza. Infatti, le recidive compaiono nel 70% circa delle pazienti con

metastasi linfonodali alla presentazione, contro il 20-30% circa delle pazienti senza metastasi linfonodali. Inoltre, nelle neoplasie di piccole dimensioni (inferiori a 2 cm di asse maggiore) la sopravvivenza a 5 anni diminuisce con l'aumentare del numero dei linfonodi metastatici, passando dal 87.4% nelle pazienti con 1-3 linfonodi metastatici al 66% nelle pazienti con più di 4 linfonodi metastatici.

Il linfonodo sentinella è il primo linfonodo che riceve il drenaggio linfatico da una determinata neoplasia. Pertanto lo stato del linfonodo sentinella riflette lo stato dei linfonodi regionali. Il linfonodo sentinella viene identificato con un tracciante radioattivo o con un colorante vitale ^(89,90) e quindi asportato. Il linfonodo viene esaminato istologicamente e, se sono presenti metastasi, il chirurgo procede con l'asportazione dei rimanenti linfonodi ascellari. Nel campo della patologia mammaria, la tecnica del linfonodo sentinella è ancora gravata da un 5% di falsi negativi, cioè di casi che pur presentando un linfonodo sentinella negativo hanno metastasi nei rimanenti linfonodi ascellari. L'ipotesi più probabile è un sistema di drenaggio linfatico ascellare troppo complesso che rende difficoltosa l'identificazione del vero linfonodo sentinella.

Dimensioni della neoplasia: le dimensioni della neoplasia sono un fattore prognostico indipendente molto importante. La sopravvivenza a 20 anni è dell'86% per i carcinomi di dimensioni inferiori a 1cm. Scende al 69% per le neoplasie di dimensioni comprese tra 1.1 e 2 cm. Le dimensioni della neoplasia devono essere valutate dal patologo sia con un accurato esame macroscopico sia con la conferma istologica, possibilmente utilizzando macrosezioni che consentono di utilizzare la neoplasia istologicamente nella sua interezza.

Accanto ai fattori prognostici indicati nel sistema TNM, vengono utilizzati altri fattori utili come indicatori di risposta alla terapia.

Recettori ormonali: la valutazione dei recettori per estrogeno e progesterone è considerata molto importante per prevedere la risposta alla terapia ormonale (**fattore predittivo**). Infatti la NIH americana nel 2000 ⁽¹⁹⁾ ha stabilito che la terapia ormonale deve essere somministrata solo alle donne che hanno una neoplasia che esprime i recettori per estrogeno o progesterone. La presenza di recettori per estrogeno e progesterone viene determinata su

sezioni istologiche con tecnica immunoistochimica che utilizza anticorpi specifici. Circa il 60% dei carcinomi invasivi presenta una positività intensa ai recettori estro-progestinici. In genere, i carcinomi poco differenziati costituiscono la maggior parte dei carcinomi che non esprimono i recettori estro-progestinici.

Indice di proliferazione cellulare: la percentuale di cellule che sono attivamente in ciclo cellulare viene valutata con la colorazione immunoistochimica con siero anti ki67. La proteina ki67 si localizza nel nucleo delle cellule che sono in ciclo replicativo. I carcinomi poco differenziati hanno un alto indice di proliferazione cellulare.

HER-2/NEU (c-erb-B2): HER-2/neu è un gene localizzato sul cromosoma 17q12-21.32, che codifica per una proteina transmembrana di 185kDa, simile all'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). L'importanza del gene HER-2/neu è emersa recentemente come indicatore di risposta all'immunoterapia. La valutazione di HER-2/neu viene fatta con immunoistochimica o con ibridazione in situ a fluorescenza (FISH). La prima rivela la sovraespressione della proteina, utilizzando un anticorpo specifico. La seconda rivela l'amplificazione del gene. Entrambi i metodi vengono applicati su sezioni ottenute da blocchetti di tessuto paraffinato in formalina e incluso in paraffina, con una metodica di routine.

1.6 Carcinoma della mammella maschile

Il carcinoma della mammella maschile è una rara neoplasia maligna, morfologicamente simile al carcinoma della mammella femminile (OMS 2003)⁽⁵⁾. Analogamente alla controparte femminile, il carcinoma della mammella può manifestarsi sia in situ che invasivo. Ha incidenza maggiore in Asia e Africa.

Fattori predisponenti sono:

Ginecomastia: compare nel tessuto adiacente al carcinoma nel 40% dei casi. Tuttavia non è ancora quantificabile il rischio di sviluppare un carcinoma per i pazienti portatori di ginecomastia.

Fattori ormonali: elevati livelli di estrogeni e prolattina favoriscono l'insorgenza del carcinoma. In effetti può comparire in soggetti trattati con estrogeni per carcinoma prostatico, nei pazienti con sindrome di Klinefelter, in pazienti con iperestrogenismo correlato a cirrosi epatica.

Fattori familiari: si calcola che il 5% circa dei carcinomi maschili sia su base familiare. Purtroppo la rarità di questa malattia non ne consente di definire con esattezza il rischi nei singoli casi.

All'esame macroscopico ed istologico l'aspetto è sovrapponibile a quello del carcinoma della mammella femminile. Si tratta generalmente di carcinoma di tipo duttale, che può presentarsi sia nella forma in situ sia nella forma invasiva. Prevalgono le forme poco differenziate, sia nelle lesioni in situ che in quelle invasive. Il carcinoma lobulare è un evento eccezionale nella mammella maschile, poichè in questa i lobuli non si formano.

Analogamente al carcinoma femminile, le cellule neoplastiche esprimono frequentemente recettori per estrogeno e progesterone. Inoltre nel 95% dei casi sono presenti anche i recettori per androgeno⁽⁸⁶⁾.

I fattori prognostici e predittivi sono gli stessi descritti precedentemente per la mammella femminile. Tuttavia proprio perchè predominano i carcinomi poco differenziati e le neoplasie vengono a contatto più facilmente con la gabbia toracica, le forme maschili sono più aggressive.

2.0 TERAPIA DEL CARCINOMA MAMMARIO

La terapia del cancro della mammella ⁽²⁰⁾ può avere intenti curativi per tumori in I-II-III stadio mentre è da ritenersi solamente a scopo palliativo nelle pazienti in IV stadio o già precedentemente trattate, che sviluppano metastasi a distanza o recidive locali non suscettibili più di asportazione radicale.

L'estensione della malattia e l'aggressività biologica della neoplasia rappresentano i principali fattori che condizionano i risultati del trattamento primitivo.

Per circa il 70% di secolo la mastectomia radicale è stata considerata la terapia standard per questo tipo di affezione, anche in considerazione del fatto che la gran parte delle pazienti si presentava con una neoplasia localmente avanzata (terzo stadio).

Diversamente dal passato, quando la terapia del cancro della mammella era di pertinenza esclusivamente chirurgica, oggi la stessa viene concepita con un approccio multimodale dove, oltre alla chirurgia, rivestono un ruolo altrettanto importante la radioterapia, la chemioterapia, l'ormonoterapia e l'immunoterapia.

2.1.1 *Trattamento chirurgico*

L'approccio chirurgico rappresenta il trattamento di scelta nelle donne con carcinomi in situ ed invasivo, alla terapia conservativa chirurgica può essere associata la radioterapia adiuvante.

In caso di riscontro occasionale di CLIS si può non effettuare ulteriori trattamenti ed eseguire controlli periodici clinico mammografici. In caso di CLIS multicentrico e con fattori di rischio positivi può essere proposta una chirurgia radicale con ricostruzione o una mastectomia "skin sparing" con ricostruzione immediata, anche bilaterale.

Per quanto riguarda il DCIS, l'indice prognostico più correlabile alla comparsa di recidiva è il Van Nuys Prognostic Index Scoring System ⁽²¹⁻²²⁻²³⁻²⁴⁻

²⁵⁾ (Tabella1) ed è anche il sistema più facilmente correlabile nell'iter decisionale del trattamento del CDIS (Tabella 2).

Attualmente è riconosciuto che i CDIS con grado nucleare elevato si comportano più aggressivamente rispetto a quelli con nuclei regolari quindi tale distinzione è raccomandata per poter predire il rischio di recidiva locale e il rischio di carcinoma invasivo).

Tabella 1

<i>Van Nuys Prognostic Index Scoring System</i>			
Parametro	1 Punto	2 Punti	3 Punti
Grado di differenziazione	CDIS a basso grado	CDIS a grado intermedio	CDIS ad alto grado
Margini liberi	< o = 10 mm	1-9 mm	< 1mm
Dimensione lesione	< o = 15 mm	16-40 mm	> 41 mm
Età	> 60 aa	40-60 aa	< 40 aa

Tabella 2

<i>Score Finale</i>		
Gruppo 1	4-5-6 punti	Chirurgia conservativa esclusiva
Gruppo 2	7-8-9 punti	Chirurgia conservativa+Radioter. adiuvante
Gruppo 3	10-11-12punti	Mastectomia +/- Ricostruzione

In tutti i casi di CDIS, sia ad alto grado che non ad alto grado, indipendentemente deve essere tenuto in considerazione che oltre il 50% di tali recidive intramammarie risultano infiltranti e non più in situ con chiari risvolti negativi sulla prognosi.

Nei CDIS indipendentemente dal grado e dell'estensione , non trova indicazione la dissezione ascellare radicale. In casi selezionati, CDIS di grado 3 esteso può essere indicata la biopsia del linfonodo sentinella, e

questo accade quando la lesione è estesa o quando il patologo non è sicuro della fase in situ.

Carcinoma Microinvasivo: è definito da neoplasie con componente dominante in situ e uno o più foci di invasione non superiore al millimetro ⁽⁵⁾; se il focolaio di invasione supera tale misura la neoplasia è classificata come pT1a.

Il trattamento chirurgico è lo stesso del CDIS a cui però va aggiunta la biopsia del linfonodo sentinella.

Malattia di Paget: nel caso di malattia Paget senza massa palpabile il trattamento consiste nell'asportazione di un cilindro di parenchima centrale (compreso complesso areola-capezzolo)⁽⁷⁶⁾ o una mastectomia totale o skin sparing mastectomy in entrambi i casi eventualmente seguita da ricostruzione ⁽²⁶⁾. Quando invece è presente massa palpabile è suggeribile eseguire una mastectomia radicale modificata più eventuale ricostruzione. In alternativa è possibile eseguire quadrantectomia centrale e dissezione ascellare se il nodulo ha dimensioni < a 2,5 cm e non è a più 3 cm dal capezzolo.

Carcinomi invasivi: nelle neoplasie inferiori ad 1 cm il trattamento prevede chirurgia conservativa e biopsia linfonodo sentinella o dissezione ascellare. Nei tumori inferiori a 3 cm multicentrici è indicata mastectomia radicale modificata ed eventuale ricostruzione; mentre in quelli localizzati in regione retroareolare è proponibile quadrantectomia centrale o mastectomia radicale modificata associata a biopsia linfonodo sentinella o dissezione ascellare. Per neoplasie con dimensioni > 3 cm l'intervento di scelta è la mastectomia radicale modificata e dissezione ascellare⁽²⁷⁾. In questi casi è proponibile una chemioterapia neoadiuvante, se tale trattamento induce una riduzione considerevole della neoplasie, è possibile proporre un intervento di tipo conservativo.

Trattamento chirurgico delle microcalcificazioni e delle opacità non palpabili: vengono trattate chirurgicamente quelle microcalcificazioni che presentano caratteri radiologici dubbi o sospetti, dopo l'impiego di microbiopsia in

stereotassi per l'accertamento istologico preoperatorio; asportazione del parenchima ghiandolare con microcalcificazione e verifica radiologica del pezzo chirurgico, per valutare l'avvenuta asportazione delle microcalcificazioni o dell'opacità nodulare.

2.2 Radioterapia

L'associazione tra chirurgia e radioterapia costituisce lo standard nel trattamento conservativo del carcinoma invasivo della mammella ^(28,29). Molteplici studi clinici condotti negli ultimi 30 anni hanno consentito di giungere alla conclusione che, nei tumori di diametro inferiore a 3 cm, il trattamento conservativo della mammella offre la stessa probabilità di controllo locale di malattia rispetto alla mastectomia totale, a condizione che la chirurgia sia seguita dalla radioterapia, condotta sull'intero volume mammario residuo.

I risultati dell'associazione tra chirurgia conservativa e radioterapia sono validati da studi con un lungo follow-up ^(30,31,32,33) e da diverse metanalisi ⁽³⁴⁾; la possibilità di recidiva a 5 anni è compresa tra il 4 e 8%, con tassi variabili in funzione di numerosi parametri prognostici. Inoltre, è importante rilevare come in tutti gli studi la mortalità delle pazienti operate conservativamente sia sostanzialmente sovrapponibile a quelle delle paziente sottoposte a mastectomia.

E' nozione comune che un trattamento locale inadeguato si associ ad un aumento delle recidive locali, mentre la possibilità che tale aumento possa modificare il rischio di disseminazione a distanza della malattia è tuttora controversa. In effetti, la radioterapia dopo chirurgia conservativa è in grado di ridurre il 75% (o, in altri termini di 4 volte) il rischio di recidiva locale. Al contrario almeno 11 studi randomizzati di confronto fra chirurgia conservativa da sola rispetto a chirurgia conservativa più radioterapia non hanno dimostrato differenze di sopravvivenza globale, sebbene l'ultimo aggiornamento della metanalisi riporti che un miglior controllo locale della malattia si associa ad un guadagno del 3% circa nella sopravvivenza a 10 anni (EBCTCG 2000 Overview) ^(32,35,36,37).

Nel carcinoma duttale in situ con aspetto mammografico di nodulo o microcalcificazioni il trattamento radiante postchirurgico è in grado di ridurre la percentuale di recidive locali.

Nelle forme in situ a basso grado (G1) unificali, inferiori ad 1 cm con margini di resezione chirurgica ampi (> 1 cm) non vi è indicazione al trattamento radiante analogamente al CLIS/NL.

Radioterapia dopo mastectomia

La radioterapia adiuvante dopo mastectomia è indicata se il diametro della neoplasia è superiore a 5 cm, in presenza di infiltrazione della cute e/o del muscolo pettorale, in caso di positività dei margini di resezione, in presenza di 4 o più linfonodi interessati da metastasi, e se è presente superamento macroscopico della capsula linfonodale.

Nelle pazienti con queste caratteristiche la radioterapia postoperatoria si è dimostrata in grado di migliorare non solo il controllo locale, ma anche la sopravvivenza globale e quella libera da malattia indipendentemente dal trattamento sistemico eseguito.

La radioterapia della parete toracica e dei linfonodi regionali dopo mastectomia diminuisce l'incidenza di recidive loco-regionali.

Radioterapia sulle stazioni linfonodali regionali ^(29,30,38,39)

Il trattamento radiante sulle stazioni linfonodali sovraclaveari trova indicazione in presenza di positività linfonodale ascellare; il rischio di localizzazioni linfonodali sovraclaveari è più elevato nelle pazienti con un numero di linfonodi ascellari metastatici (macro-micrometastasi) uguale o maggiore a 4, in particolare, con linfonodi del livello III.

Diversi studi hanno dimostrato che il trattamento radiante sulle stazioni linfonodali ascellari non trova indicazione in caso di linfoadectomia ascellare, sia per il basso rischio di recidiva in tale sede, sia per gli importanti effetti collaterali indotti dal trattamento radiante come il linfedema e i sintomi correlati alla fibrosi postattinica dei tessuti ascellari. Può essere giustificata in caso di linfonodi positivi ed asportazione di un numero di linfonodi non adeguati (inferiori a 10).

Per quanto riguarda l'irradiazione della catena mammaria interna non vi è consenso basato su evidenze cliniche consolidate. Può essere giustificata in presenza di metastasi linfonodali ascellari > 3 di tumori dei quadranti interni.

Stato dei margini di resezione ⁽³²⁻⁴⁰⁾: attualmente il margine è considerato negativo quando dista almeno 2 mm dalla malattia microscopica, close se inferiore a 2mm e positivo se interessato istologicamente.

La percentuale di ricaduta locale a 5 anni è del 12% in caso di margine positivo, del 7% quando è inferiore a 2 mm e del 5% se superiore a 2 mm.

Nelle pazienti con margine positivo può essere giustificato un sovradosaggio radioterapico sul letto chirurgico a completamento dell'irradiazione dell'intera mammella qualora non fosse possibile un reintervento o nel caso la paziente rifiuti. La presenza di neoplasia lobulare in situ sul margine non richiede sovradosaggio.

Controindicazioni al trattamento radiante

Esistono tuttavia precise controindicazioni alla radioterapia:

controindicazioni assolute sono lo stato di gravidanza e la persistenza di positività marginale dopo un "ragionevole" numero di rescissioni. Controindicazioni relative sono rappresentate da precedenti irradiazioni di volumi toracici o della mammella controlaterale (in questi casi la decisione richiede la conoscenza dettagliata di tutti i dati tecnici relativi alla precedente irradiazione), la presenza di collagenopatie (per l'elevata incidenza di effetti collaterali importanti legati alle vasculite), infine nelle mammelle di dimensioni talmente cospicue la scarsa accuratezza e riproducibilità del trattamento radiante potrebbero influenzare negativamente la morbilità, la cosmesi e il risultato clinico.

Effetti collaterali indotti dal trattamento radiante

Diversi Trials condotti negli anni '70 avevano dimostrato nelle pazienti sottoposte a radioterapia un incremento di tossicità cardiaca e polmonare, tali dati non sono stati confermati dai trials più recenti, verosimilmente a

causa delle profonda evoluzione delle tecniche di localizzazione dei volumi bersaglio e di irradiazioni avvenute negli ultimi decenni.

Il rischio di tossicità cardiaca tardiva è correlata alla sede irradiata (rischio più elevato se viene irradiata la mammella o parete toracica di sinistra), all'utilizzo di un fascio anteriore diretto di fotoni per l'irradiazione delle catene linfonodali mammaria interna e dall'esecuzione di sovradosaggio sui quadranti mammari interni di sinistra.

Con le tecniche di irradiazione attualmente disponibili il rischio di tossicità polmonare tardiva appare trascurabile.

Particolare attenzione va posta nel ridurre quanto più possibile la dose al cuore nelle pazienti che hanno effettuato chemioterapia con antracicline e/o Trastuzumab per il maggior rischio di cardiotoxicità indotta dal trattamento sistemico.

2.2 Trattamento oncologico sistemico

Lo scopo primario della terapia sistemica adiuvante è quello di aumentare la sopravvivenza delle donne operate per tumore della mammella, intervenendo sulle potenziali micrometastasi residue al trattamento locale, responsabili della recidiva e della morte della paziente.

Esistono numerose evidenze che il processo di metastatizzazione rappresenti nella maggior parte dei casi un evento precoce e che il tumore mammario debba quindi essere sempre considerato in un'ottica sistemica.

Gli studi di metanalisi, insieme a numerosi studi randomizzati, hanno dimostrato ormai in modo chiaro che la terapia sistemica adiuvante riduce il rischio di recidiva e di morte per tumore^(41,42).

Questi studi indicano tuttavia che la riduzione del rischio è indipendente dal rischio stesso, ma che il suo valore assoluto può essere molto diverso in rapporto all'entità del rischio iniziale.

La definizione della categoria del rischio associata alla valutazione dei fattori predittivi di probabilità di efficacia del trattamento rappresentano i punti cruciali per la scelta della strategia terapeutica post chirurgica.

Devono essere quindi essere disponibili i seguenti parametri : lo stato linfonodale, le dimensioni patologiche della neoplasia, il grado istologico, lo stato dei recettori ormonali, lo stato del recettore HER2 e la presenza di invasione vascolare e linfatica. Altri parametri biologici utili sono rappresentati dall'indice proliferativi e UPA-PAII, mentre al momento attuale non appaiono significativi la determinazione di p53, Bcl2, EGF, indice apoptotico, p170, topoisomerasi II alfa, ciclica . Infine l'utilità di specifici profili genici sono attualmente oggetto di studi prospettici di fase III e quindi non utilizzati nella routine.

Nel caso di DCIS appare attualmente discussa la necessità di eseguire una terapia ormonale. I risultati dello studio americano NSABP B-24 hanno dimostrato che un beneficio in termini di riduzione del rischio di recidiva è presente solo per i tumori ormono-sensibili. I risultati di questo studio non sono tuttavia confermati da un successivo trial internazionale , nel quale il tamoxifene, in pazienti con DCIS ha determinato una riduzione di recidiva di carcinoma in situ, ma non di forme invasive, mentre la radioterapia era in grado di ridurre l'incidenza di recidiva in entrambi i casi.

Terapia sistemica adiuvante

La terapia adiuvante si avvale sostanzialmente di tre diversi tipi di trattamento: la chemioterapia, la terapie endocrina, e la terapia con anticorpo monoclonale anti HER-2.

Nelle seguenti tabelle (Tabelle 3 e 4) sono riportati i dati relativi alla riduzione proporzionale annua del rischio di recidive e di morte suddivisi per fascia di età (EBCTCG, Oxford 2005) ⁽⁴²⁾.

Tabella 3: Effetto medio della polichemioterapia

Età	Riduzione annuale Rischio di recidiva	Rischio annuale rischio di morte
< 40 aa	40 %	29%

40-49 aa	36 %	30 %
50-59 aa	23 %	15 %
60-69 aa	13 %	9 %
< 70 aa	12 %	13 %

Tabella 4: Effetto medio del Tamoxifene per 5 anni (in pazienti con recettori estrogenici positivi)

Età	Riduzione annuale Rischio di recidiva	Rischio annuale rischio di morte
< 40 aa	46 %	39 %
40-49 aa	29 %	24 %
50-59 aa	34 %	24 %
60-69 aa	45 %	35 %
< 70 aa	51 %	37 %

Ormonoterapia

La scoperta dei recettori estrogenici e per il progesterone nei carcinomi mammari, e la correlazione tra questi e la risposta alla terapia endocrina, ha dato la conferma scientifica del ruolo giocato dagli ormoni nel cancro della mammella.

La presenza di recettori ormonali è un indice di maggiore differenziazione del tumore ed infatti la percentuale di risposta al trattamento ormonale, nei tumori con recettori positivi, raggiunge l' 80% , mentre scende sotto al 10% nei tumori in cui sono assenti i recettori per gli estrogeni. I recettori per il progesterone sono stati individuati in circa il 40% dei tumori con positività recettoriale per gli estrogeni. Attualmente la terapia ormonale, sempre guidata dalla positività dei recettori ormonali, può essere effettuata con antiestrogeni (Tamoxifene), inibitori delle aromatasi^(44,46) o ablazione ovarica (farmacologia o chirurgica)⁽⁴⁵⁾. Fra gli antiestrogeni, il tamoxifene è il composto più frequentemente impiegato nella pratica clinica. Gli effetti

collaterali sono: improvvise vampate di calore, ritenzione di liquidi e cambiamenti dell'umore, meno frequentemente possono osservarsi fenomeni tromboembolici e cataratta, inoltre nelle pazienti che assumono Tamoxifene va preso in considerazione l'aumento del rischio di patologia neoplastica endometriale.

Attualmente gli inibitori delle aromatasi rappresentano uno standard terapeutico dell'ormonoterapia nelle donne in postmenopausa e non solo nei casi dove esistono controindicazioni assolute al tamoxifene. Sulla base dei risultati di diversi studi clinici internazionali prospettici e randomizzati che hanno interessato migliaia di pazienti, oggi gli inibitori delle aromatasi possono venire utilizzati o da soli per 5 anni o in sequenza dopo 2-3 anni di terapia con Tamoxifene e comunque per 5 anni complessivi, o dopo 5 anni di Tamoxifene nelle pazienti ad alto rischio di ricaduta e per altri 2-5 anni⁽¹⁹⁾. Al momento non sono disponibili dati di confronto tra le diverse modalità d'impiego degli inibitori delle aromatasi.

Ablazione ovarica : il ruolo dell'amenorrea nella riduzione del rischio di recidiva è stato a lungo dibattuto. La soppressione ovarica secondo i dati della metaanalisi di Oxford appare in grado di ridurre, rispetto ai controlli, la probabilità assoluta di recidiva del 2,3% e la mortalità cancro-correlata del 3,2%. Quando le pazienti sono trattate con chemioterapia tuttavia, l'aggiunta di una soppressione ovarica non induce significativi miglioramenti dei risultati. Un possibile vantaggio risulta solo nelle donne di età inferiore ai 40 anni, verosimilmente per la minor probabilità in questa fascia di età di una amenorrea indotta dalla chemioterapia. Una meta-analisi pubblicata recentemente⁽²⁴⁾ ha analizzato il ruolo della soppressione ovarica in oltre 11.000 donne inserite in studi clinici con impiego di LH-RH analoghi, in questo studio la probabilità di recidiva è risultata inferiore, ma non significativamente, nelle pazienti in cui è stata ottenuta una soppressione ovarica rispetto alle pazienti non trattate (HR 0,72, p=0.08). Nessun vantaggio è stato osservato con l'aggiunta di LHRH antagonisti rispetto al solo tamoxifene, mentre l'aggiunta di LHRH -antagonisti a chemioterapia (con o senza tamoxifene) ha prodotto una significativa riduzione della probabilità di recidiva (HR 0,88, p=0,04) e di morte. Questo vantaggio appare

fondamentalmente ristretto alle sole donne con età < 40 anni (HR 0,75 vs 0,96).

Chemioterapia ^(42,47,48,49)

La tendenza attuale è la somministrazione di cicli di polichemioterapia, cioè una associazione di più farmaci antiproliferativi.

La chemioterapia contenete antracicline risulta superiore allo schema CMF (ciclofosfamide, mitomicina, fluorouracile).

Nella scelta del regime di chemioterapia, va comunque ricordato che i vantaggi in termini assoluti di una chemioterapia a base di antracicline rispetto al CMF sono proporzionali al rischio di ricaduta, per cui se questo è basso il reale vantaggio può essere minimo.

L'impiego di Taxani in associazione o in sequenza con le antracicline è considerato una valida alternativa terapeutica nelle pazienti con linfonodi ascellari positivi, sulla base di 6 studi randomizzati. Cinque di questi studi hanno dimostrato un vantaggio in termine di sopravvivenza libera di malattia ^(27,28,29,30,31) e tre hanno dimostrato anche un vantaggio in termini di sopravvivenza globale ^(27,30,31).

L'impiego di regimi di chemioterapia ad elevata densità di dose ⁽³⁴⁾ a ad alte dosi con supporto di cellule staminali autologhe non trovano indicazioni al di fuori di studi clinici.

Terapia con anticorpi monoclonali ^(50,51)

Gli studi clinici ⁽³⁵⁻³⁶⁾ hanno dimostrato l'efficacia dell'anticorpo monoclonale anti-HER-2 Trastuzumab, impiegato dopo o assieme alla chemioterapia adiuvante. I vantaggi in termini di riduzione del rischio di recidiva è evidente in tutti i sottogruppi di pazienti indipendentemente quindi dallo stato recettoriale, dallo stato linfonodale e da altri fattori prognostici ⁽³⁵⁻³⁷⁾.

Sebbene la durata ottimale della terapia adiuvante con Trastuzumab non sia ancora ben definita, è attualmente approvato il trattamento per un anno dopo chemioterapia.

In considerazione della cardiotossicità indotta dal farmaco è necessario uno stretto monitoraggio della funzionalità cardiaca.

Chemioterapia neoadiuvante

Il termine “neoadiuvante” si riferisce all’ impiego preoperatorio dei farmaci citotossici.

Gli stessi regimi di chemioterapia utilizzati in fase adiuvante , possono essere utilizzati nella chemioterapia primaria o neoadiuvante in pazienti operabili che desiderano effettuare chirurgia conservativa, ma che dovrebbero essere sottoposte a mastectomia per le dimensioni della neoplasia (> 2 cm) o in quelle situazioni dove comunque è indicata una chemioterapia adiuvante.

Gli studi randomizzati che hanno confrontato (pazienti con neoplasie operabili da T1 a T3) la stessa chemioterapia impiegata in fase adiuvante o come trattamento preoperatorio, non hanno dimostrato alcuna differenza in termini di sopravvivenza libera da malattia e globale tra i due approcci, mentre la chemioterapia adiuvante permette di aumentare significativamente il numero di interventi conservativi.

L’impiego di trastuzumab in associazione alla chemioterapia neoadiuvante in pazienti HER-2 positive è ancora riservato all’ambito di studi clinici, sebbene abbia consentito di ottenere la più alta percentuale di remissioni patologiche complete descritte in letteratura ⁽⁴¹⁾.

3.0 INNOVAZIONI

3.1 *“Teoria del lobo malato”*

La teoria del “lobo malato”⁽⁵²⁾ e' stata elaborata da Tot (Figura 1), basandosi su un' esperienza ventennale e su più di 5000 casi consecutivi di carcinoma della mammella. Questi sono stati analizzati utilizzando macrosezioni. Questo metodo di sezioni istologiche consente di avere quella contiguità di tessuto necessaria all' analisi della estensione e della distribuzione delle lesioni che appartengono al carcinoma della mammella.

La teoria del lobo malato ipotizza che il CDIS, e di conseguenza il carcinoma mammario in genere, è una malattia lobare. Questo significa che i foci di tumore in situ, spesso multipli, sia che si sviluppino simultaneamente o in maniera asincrona, sono localizzati in un singolo lobo della mammella.

Tot suppone che il lobo in cui insorge la neoplasia, definito lobo malato sia nato geneticamente mal costruito, presentando alcune instabilità genetiche sin dalla sua iniziazione. Poi, l'accumularsi di mutazioni genetiche durante il periodo post-natale porterebbe alla trasformazione maligna di cellule epiteliali in qualunque parte del lobo malato.

Tot ritiene che questo lungo processo inizi durante il periodo fetale e che possa essere influenzato ed eventualmente interrotto da escissioni radicali del lobo malato e possibilmente da altri interventi terapeutici.

In aggiunta alla trasformazione maligna a livello cellulare, ci sono altri due altri bersagli costanti dell' evento neoplastico: il processo di lobularizzazione e il processo di arborizzazione. Infatti, una lobularizzazione alterata è costantemente osservata nella maggioranza dei casi di CDIS, mentre varie alterazioni della arborizzazione sono caratteristica dei CDIS d'alto grado.

La correlazione temporale della trasformazione maligna delle cellule all'interno del lobo malato può essere molto varia. Il coinvolgimento simultaneo di più cellule epiteliali all'interno del lobo malato porta al rapido sviluppo di CDIS, generalmente di alto grado, diffuso ed esteso. In questi casi, la trasformazione maligna potrebbe coinvolgere TDLUs molto distanti all'interno del lobo malato con tempi che variano da diversi anni a diverse decadi.

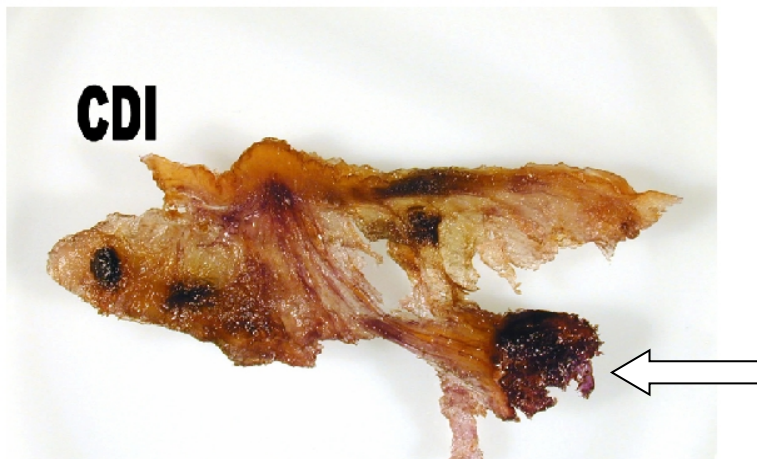


Figura 1: Dal capezzolo si irradiano dotti che costituiscono la parte terminale del lobo. invasivo unicentrico e unifocale

Conseguenze e prospettive future

Dimostrando che la teoria del lobo malato è corretta, l'estensione della malattia nel carcinoma mammario in situ potrebbe essere definita come un'area che include tutte le lesioni osservate e che coincide esattamente con l'area delimitata dai confini del lobo malato. In quest'ottica, gli interventi radicali dovrebbero modificare il loro obiettivo e spostare l'attenzione sulla escissione o distruzione dell'intero lobo mammario.

Inoltre la multicentricità del carcinoma mammario potrebbe ridefinirsi come presenza di due o più lobi malati all'interno della mammella e la multifocalità come presenza di più di un focus tumorale all'interno del lobo malato.

Infine, poiché il lobo malato si formerebbe durante la vita intrauterina, questa teoria suppone che l'influenza prenatale di differenti fattori nocivi possa giocare un ruolo nel predisporre l'individuo al cancro della mammella. D'altra parte sono necessarie decenni di vita post-natale per lo sviluppo del carcinoma mammario e l'intervento chirurgico interromperebbe questo lungo processo solo con la distruzione dell'intero lobo malato.

La distribuzione locale del CDIS nella mammella

Faverly e Holland hanno studiato la distribuzione locale del CDIS nella mammella utilizzando la whole-organ technique⁽⁵³⁾ che consiste in una correlazione radiologica-istologica. La si ottiene radiografando,ogni 5mm, sezioni di mammella congelata e i blocchi di tessuto per le sezioni paraffinate provengono da quelle aree che mostrano alla radiografia lesioni sospette (microcalcificazioni o distorsioni architetturali) o da aree che mostrano grossolani cambiamenti sospetti.

Questa correlazione radiografica-istologica permette una ricostruzione dettagliata della sede, della estensione e della distribuzione dei foci tumorali nella mammella e una valutazione molto specifica della potenziale multifocalità o multicentricità della neoplasia. In aggiunta permette di conoscere l'estensione mammografia delle microcalcificazioni e l'estensione istopatologica del tumore, risolvendo ogni discordanza tra dimensioni mammografiche e istologiche del CDIS.

Per distribuzione multicentrica si intende un coinvolgimento tumorale in due o più lobi. Diversamente, il tumore unicentrico ha una distribuzione unilobare. Un tumore unicentrico, può essere multifocale e cioè crescere come tanti piccoli microfocolai tumorali all'interno del singolo lobo.

Gli studi di Faverly e Holland concludono che generalmente il CDIS non ha una distribuzione multicentrica bensì multifocale e i foci tumorali si distribuiscono solitamente all'interno di una particolare regione che molto probabilmente corrisponde a un segmento mammario, senza la frapposizione di aree di tessuto mammario non colpito dalla neoplasia. In termini pratici, questo significa che due aree apparentemente separate di microcalcificazioni mammografiche maligne non rappresentano aree separate di CDIS bensì un ampio tumore nel quale le due aree mammograficamente evidenziate sono connesse da CDIS che è mammograficamente invisibile a causa delle insufficienti dimensioni delle microcalcificazioni. Il concetto che il CDIS non sia multicentrico è sostenuto dai dati clinici che mostrano come le recidive tumorali locali dopo trattamento conservativo di CDIS compaiono vicino ai margini di sezione. Questo a dire che residui di CDIS sono fonte di recidive

locali. Dunque la rimozione completa necessita di un' ampia escissione con un margine minimo di 2 cm attorno alla area mammografica di microcalcificazione e di questi il cm più esterno deve essere libero da tumori microscopici.

Infine, gli studi tridimensionali di Faverly e Holland mostrano che la crescita del CDIS può essere sia continua sia discontinua. Entrambe recidivano circa con la stessa frequenza ma, dai casi studiati, la crescita continua si associa più frequentemente al CDIS poco differenziato suggerendo un' origine unica, mentre il CDIS ben differenziato si associa più frequentemente ad una crescita discontinua suggerendo un'origine multifocale. I CDIS mediamente differenziati presentano invariabilmente una crescita continua o discontinua.

3.3 Nuove tecniche di radioterapia

Irradiazione parziale accelerata nelle neoplasie mammarie in stadio iniziale sottoposte a chirurgia conservativa.

Razionale della irradiazione parziale della mammella

La filosofia attuale alla base del trattamento locale del carcinoma della mammella prevede il trattamento dell'intera ghiandola facendo ricorso alla mastectomia totale o associando la chirurgia conservativa e la radioterapia postoperatoria sulla mammella residua. La maggior parte delle linee guida suggeriscono di somministrare una dose di circa 45-50 Gy alla totalità della ghiandola mammaria; il frazionamento più correntemente utilizzato è 1.8-2.5 Gy per seduta per un totale di 5 sedute settimanali.

L'irradiazione della mammella in toto viene proposta per prevenire le recidive locali considerando come tessuto a rischio l'intero volume della mammella. A sostegno dell'utilità del trattamento dell'intera mammella vengono spesso citati i lavori del gruppo di Holland nei quali una estesa valutazione istologica dei campioni chirurgici di mastectomia in tumori clinicamente unifocali fino a

5 cm di diametro aveva rivelato la presenza di multifocalità nel 63% delle pazienti ed in particolare la presenza di foci tumorali posti ad oltre 2 cm di distanza dal tumore principale nel 43% delle mammelle esaminate ⁽⁶⁶⁾. A questo proposito, è stato però recentemente evidenziato come, grazie alla migliore definizione preoperatoria delle lesioni multifocali dovuta ai superiori standard qualitativi della mammografia, almeno parte delle pazienti dello studio del gruppo di Holland non sarebbero oggi comunque candidate ad una chirurgia conservativa ⁽⁶³⁾. Inoltre, studi istopatologici più recenti suggeriscono che nelle pazienti candidate ad una chirurgia conservativa secondo le linee guida attuali sia improbabile l'estensione microscopica di malattia oltre 1 cm dai margini di resezione chirurgica ^(34,64,71).

Un altro dato deriva dal fatto che la maggior parte delle recidive locali si verificano nel quadrante mammario dove era localizzata la neoplasia primitiva, indipendentemente dal fatto che la paziente venga sottoposta o meno radioterapia. Secondo una recente revisione di circa 10 000 casi, tale percentuale è del 71% ⁽³⁸⁾, in accordo con il dato dello studio NSABP B-06 in cui il 75% delle recidive locali si verificavano nei pressi della tumorectomia originaria ⁽³¹⁾. Al contrario, se si considerano le pazienti sottoposte a chirurgia conservativa nel loro complesso, solo il 3.3% di esse sviluppa una recidiva in un quadrante diverso da quello inizialmente interessato dal tumore.

In effetti, la storia naturale della malattia suggerisce che la ricomparsa omolaterale della neoplasia al di fuori del quadrante interessato sia da considerarsi un secondo tumore piuttosto che una recidiva locale. A conferma di ciò, l'intervallo libero da malattia della recidiva locale sviluppatasi a distanza del quadrante inizialmente interessato è in genere superiore a 5 anni, dato del tutto confrontabile all'intervallo medio di comparsa di un secondo tumore della mammella controlaterale. Inoltre, poiché il tasso di recidive insorte in un quadrante diverso da quello originario non differisce tra le pazienti sottoposte o meno a radioterapia, il reale effetto preventivo della radioterapia sulle microlesioni occulte tumorali eventualmente presenti al di fuori del quadrante indice appare quantomeno dubbio ⁽³⁸⁾.

La radioterapia è in grado di ridurre in maniera significativa l'incidenza di ricaduta intramammaria, sia nelle forme invasive che in situ.

I dati di letteratura mostrano una percentuale di ricadute al di fuori del quadrante interessato dalla neoplasia sostanzialmente simile tra le paziente sottoposte a radioterapia sull'intero volume mammario e quelle non sottoposte a trattamento radiante complementare.

Innovazioni tecnologiche nella radioterapia della mammella

Numerosi lavori pubblicati nella recente letteratura hanno determinato un ampio dibattito sulla opportunità di modificare gli attuali standard della radioterapia dopo chirurgia conservativa. In particolare, alcuni centri, stanno esplorando la possibilità di irradiare solo una parte della mammella, allo scopo di diminuire la tossicità cardiaca e polmonare, utilizzando tecniche sofisticate quali la radioterapia conformazionale tridimensionale (3D-CRT), la radioterapia a modulazione di intensità (IMRT), la brachiterapia e infine la radioterapia intraoperatoria (IORT).

Altri centri hanno invece esplorato la possibilità di accelerare il trattamento, riducendone la durata, somministrando dosi più alte per frazione ^(64,66,92,93,94,96).

In effetti numerosi dati sperimentali sostengono l'efficacia di una tecnica radioterapica mirata ad ottenere la sterilizzazione del solo letto tumorale, per lo meno in un gruppo di pazienti selezionate. Così facendo sarebbe possibile diminuire il volume di irradiazione, di conseguenza, il numero di frazioni somministrate. L'aumento della dose per frazione e la drastica diminuzione della durata del trattamento verrebbero così ottenuti con una prevedibile minor tossicità oltre che con tutti i benefici in termini di "economia globale" del trattamento.

Questi studi mettono a confronto l'irradiazione parziale (tessuto circostante il letto chirurgico) e la radioterapia standard sull'intera ghiandola mammaria.

Tabella 5

Tecniche di irradiazione parziale della mammella

Le tecniche di irradiazione parziale della mammella possono essere così suddivise:

Tecniche intraoperatorie : prevedono la somministrazione della dose utilizzando un fascio di elettroni direttamente collimati sul letto tumorale, durante l'intervento chirurgico, mediante l'utilizzo di un acceleratore dedicato. Attualmente sono in corso lo studio ELIOT (IEO Milano) che prevede di erogare sul letto chirurgico una dose di 21 Gy. L'altro studio Targit, sviluppato a Londra, che utilizza raggi X a basse energie (50 KV), la dose erogata è 20 Gy sulla superficie dell'applicatore e 5 Gy ad 1cm dall'applicatore, quest'ultimo posizionato in corrispondenza del letto tumorale.

Tecniche perioperatorie: brachiterapia interstiziale a basso o alto rateo di dose è realizzata grazie al posizionamento di vettori (aghi metallici, cateteri in materiale plastico) sulla sede di intervento ed utilizzando una sorgente di Iridio 99. (Mammosite e brachiterapia)

Tecniche Postoperatorie: che prevedono di somministrare mediante radioterapia esterna conformazionale o a modulazione di intensità una dose frazionata sul letto chirurgico e sul tessuto ghiandolare sano circostante il letto tumorale.

Per quanto riguarda la radioterapia esterna sul solo letto tumorale, le prime esperienze apparse in letteratura si devono al gruppo di Manchester e risalgono agli anni 1982-1987 ^(97,98). Le pazienti ^(64,70) in questo studio furono randomizzate in 2 gruppi costituiti da irradiazione postoperatoria del solo quadrante interessato e irradiazione convenzionale del volume mammario in toto.

Nessuna paziente era stata sottoposta a chemioterapia o ormonoterapia e ad un follow-up medio di 65 mesi il tasso di recidiva fu rispettivamente del 15 e dell'11 % per i carcinomi duttali infiltranti e rispettivamente del 34 e dell' 8% per i carcinomi lobulari infiltranti.

Recentemente l'èquipe di radioterapisti del William Beaumont Hospital ⁽⁹²⁾ ha messo a punto una tecnica di radioterapia conformazionale secondo la quale vengono somministrate dosi da 34 a 38,5 Gy in 10 frazioni e 5 giorni di trattamento. Tale frazionamento della dose è stato calcolato mediante l'utilizzo del " modello lineare quadratico" che stabilisce l'equivalenza di dose per frazionamenti differenti con prevedibile isoeffetto dal punto di vista biologico ⁽⁹⁹⁾.

Tabella 5 STUDI IN CORSO: Irradiazione Parziale versus RT standard nelle neoplasia mammarie in stadio iniziale sottoposte a chirurgia conservativa

Criteri	TARGIT	ELIOT	IMPORT	RAPID	NSABP/ RTOG	GEC/ ESTRO	IRMA
N° pz	2232	2000	2100	2128	3000	1170	3302
Età	>40	>48	>50	>40	>18	>40	>49
Dimensione T mm	<30	<25	<20	<30	<30	<30	<30
Numero N+	0	0	0	0	0-3N+	0-1N+	0-3N+
Grado	1-3	1-3	1-2	1-2	1-3	1-3	1-3
Distanza margini mm	negativi	>10	>2	Negativi	Negativi	>2 invasivi >5 CIS	>2
Tecnica RT	Periop.RX 50 KV	Periop.elettro ni5-15 MeV	Postop.RT 3D+IMRT	Postop.RT 3D	Brachiterapia Mammosite RT 3D	Brachit. a basso o alto rateo di dose	Postop. RT 3D
Dose frazionata	20 Gy 1 fraz	21 Gy 1 fraz		38,5 Gy 10 fraz biq	RTE 38,5 Gy 10 f biq Brachi e Mammo 34 Gy	Basso DR 50 Gy AltoDR 34 Gy	38,5 Gy 10 fraz biq

Gli studi randomizzati in corso attualmente in Italia sono ELIOT che mette a confronto la tecnica standard versus radioterapia intraoperatoria e lo studio

IRMA che confronta radioterapia standard versus irradiazione parziale 3D accelerata a fasci esterni.

I criteri clinici e patologici di inclusione sono i seguenti: pazienti sottoposte a chirurgia conservativa e con diagnosi di carcinoma mammario, duttale e lobulare , con dimensione della lesione < a 3 cm , margini negativi (> 2mm) e fino a 3 linfonodi ascellari metastatici. Non tutti gli studi includono il CDIS.

4.0 SCOPO DELLA TESI

In considerazione dei numerosi studi randomizzati di irradiazione parziale, e dell'attuale studio in corso IRMA (irradiazione parziale della mammella a fasci esterni) iniziato nel marzo 2007, presso l'Unità Operativa di Radioterapia Ospedale Bellaria, e che attualmente coinvolge diversi centri di radioterapia nazionali ed internazionali, abbiamo cercato di valutare se era possibile definire in maniera accurata le pazienti con basso rischio di multicentricità e quindi suscettibili di un trattamento radiante localizzato. Pertanto in un numero di casi abbiamo analizzato la correlazione, nelle neoplasie mammarie, tra istotipo e caratteristiche di unifocalità, multifocalità e multicentricità. Tale studio è stato condotto su pazienti sottoposte a mastectomia per neoplasia maligna, analizzando mediante macrosezioni il tessuto asportato, inoltre è stata valutata la possibile corrispondenza genetica di tipo clonale tra componente in situ e componente invasiva sia per le forme duttali che lobulari.

5.0 MATERIALI E METODI

Sono state oggetto di indagine le macrosezioni istologiche dell'archivio della Sezione di Anatomia Istologia e Citologia Patologica "M.Malpighi" dell'Università di Bologna in convenzione con ASL di Bologna, sede Ospedale Bellaria.

Sono macrosezioni eseguite dal 1992 al 2005. Sono state esaminate solo macrosezioni ottenute da mastectomie, per avere la possibilità di valutare la reale estensione della neoplasia. I casi sono stati selezionati in maniera casuale (random) e non sono consecutivi. Le macrosezioni sono sezioni istologiche complete dell'organo che si intende studiare.

Si è inoltre scelto di valutare la clonalità tra diverse lesioni di carcinoma duttale attraverso l'analisi mutazionale della sequenza D-loop presente nel genoma mitocondriale (mtDNA)⁽⁸⁵⁾. Inoltre è stata eseguita la definizione molecolare del cariotipo mediante aCGH⁽⁸³⁾.

5.1 Macrosezioni

Le macrosezioni si ottengono sezionando il pezzo chirurgico, perpendicolarmente alla cute, utilizzando una lama sufficientemente lunga. Le sezioni devono avere uno spessore di circa 10 mm⁽⁸⁰⁾.

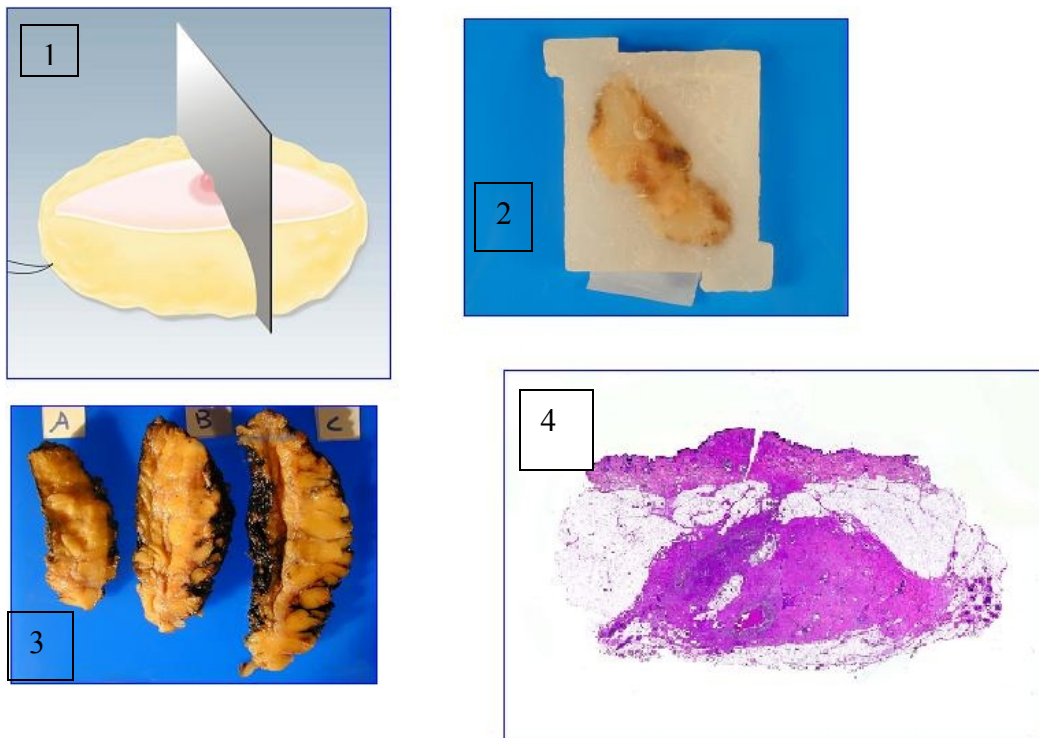
Le sezioni sono fissate in formalina vengono incluse in paraffina, utilizzando un inclusore automatico, a temperatura e pressione costante. Il relativo blocco in paraffina viene sezionato utilizzando un macrotomo (Leika), in grandi sezioni istologiche si circa 8-10 micron di spessore. Tali sezioni vengono poste su vetri appositi di dimensioni appropriate e colorate con ematossilina-eosina. (Figura 2).

Si ottengono così ampie sezioni istologiche da esaminare al microscopio.

Figura 2

Metodo

1. Le sezioni sono di 10 mm di spessore
2. Campione chirurgico (mammella da mastectomia) viene sezionato perpendicolarmente alla cute, includendo anche il capezzolo
3. Blocco paraffinato
4. Macrosezioni istologica



Le diagnosi istologiche sono basate sui criteri diagnostici proposti dalla OMS⁽⁵⁾. Per il carcinoma infiltrante è stato applicato il grading secondo Elston & Ellis⁽¹⁷⁾. Per il carcinoma duttale in situ è stato applicato il grading di Holland et al⁽⁸¹⁾ che suddivide il CDIS in: CDIS ben differenziato (grado 1); CDIS moderatamente differenziato (grado 2); CDIS poco differenziato (grado 3).

In tutti i casi sono stati contati il numero dei foci neoplastici, sia di CDIS che di carcinoma duttale invasivo NAS (CDI). Inoltre è stata valutata la presenza di infiltrazione vascolare.

Dai blocchi in paraffina è possibile diafanizzare il tessuto per una ricostruzione tridimensionale (3D) al microscopio stereoscopico.

Per lo studio 3D stereomicroscopico, i blocchetti paraffinati devono essere deparaffinati. La paraffina viene sciolta in un bagno caldo alla temperatura di 60°C (per 3-4 ore) e immersa in xilolo per altre 24 ore. Poi il tessuto viene reidratato come segue: 50% alcool assoluto e 50% xilolo (1 ora), 100% alcool assoluto (2 ore), 70% alcool (2 ore). Infine, il pezzo viene sciacquato in acqua distillata e tenuto in ematossilina di Harris per 4-5minuti. Poi, sotto acqua corrente per 10minuti e infine immerso in quattro bagni di acido alcoolico di otto minuti ciascuno. Seguono una serie di passaggi dall'alcool allo xilolo fino ad una notte in metil-salicilato. Lo studio tridimensionale viene fatto con uno stereomicroscopio (Nikon, Tokio, Japan). (Figure 3 e 4)

Figura 3: Macrosezioni 3D

A: Un lobulo normale mostra l'accentuata ramificazione

B: Una macrosezione completamente diafanizzata

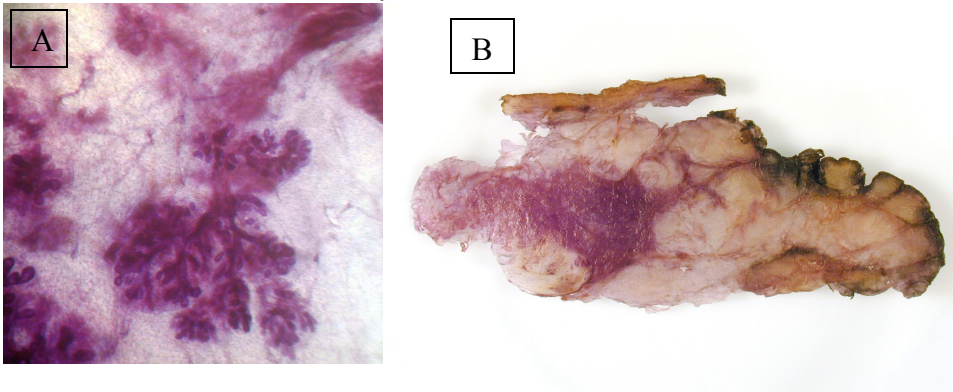
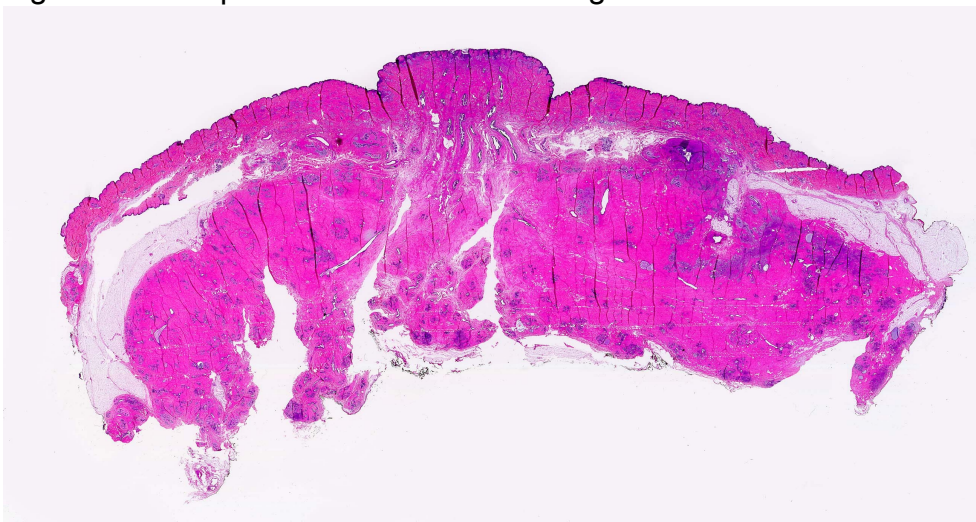


Figura 4: Esempio di macrosezione istologica



5.2 DNA mitocondriale (mtDNA)

Analisi clonale per sequenziamento della regione D-loop del mtDNA (Figura 5)

Si è scelto di valutare la clonalità tra diverse lesioni di carcinoma duttale attraverso l'analisi mutazionale della sequenza D-loop presente nel genoma mitocondriale (mtDNA). Questa regione ha funzione regolatoria nella fase di replicazione e non codifica per nessuna proteina. Caratteristiche a vantaggio di questo marker sono l'elevato tasso di mutazione con particolare riferimento alla porzione di circa 600 bp posizionata tra il nucleotide 16000 e il 50, considerando come riferimento il mtDNA circolare lungo 16569 basi descritto da Anderson et Al.⁽⁵⁴⁾

Recentemente si è stimato in modo sufficientemente preciso il tasso di mutazione della regione D-loop a livello di mutazioni somatiche: esiste uno studio basato sul tasso di mutazione in relazione all'età condotto su fibroblasti secondo il quale si ricava il valore di 1.8×10^{-5} mutazioni per bp. Il mtDNA è molto numeroso all'interno di ciascuna cellula con 10^3 fino a 10^4 copie, per la maggior parte identiche (omoplasma) alla nascita⁽⁵⁵⁾ HA. Generalmente le mutazioni del mtDNA vengono generate durante la fosforilazione ossidativa. La bassa efficienza di sistemi di riparo del DNA e la mancanza di istoni permettono un accumulo sempre maggiore di queste mutazioni somatiche⁵⁴.

Recentemente alcuni studi hanno descritto un numero consistente di mutazioni all'interno del tessuto tumorale soprattutto nella regione D-loop in larga parte in omoplasma. Questo è dipeso fondamentalmente dal fatto che esiste poca pressione selettiva in questa regione e la variazione di alcuni nucleotidi non interferisce enormemente sul tasso replicativo del mtDNA^(56,57,58).

Il fatto di trovare un considerevole numero di mutazioni somatiche in omoplasma nel tessuto neoplastico, sembra essere dovuto per alcuni autori all'espansione di tali mutazioni guidate da una forte selezione del genotipo mutante con effetti importanti nella tumorigenesi. Per contro Coller et Al⁽⁵⁵⁾ fa emergere il fatto che l'abbondante frequenza di mutazioni identificate in omoplasma nei tumori potrebbe essere dovuta semplicemente alla selezione

casuale dato il tasso molto elevato di divisioni cellulari nei tessuti neoplastici. Secondo questo studio si stima che una cellula epiteliale staminale va incontro a circa 200 divisioni cellulari mentre una cellula tumorale progenitrice va incontro a circa 600 divisioni cellulari, il che giustifica la presenza di un numero elevato di mutazioni in omoplasma per deriva genetica.

Le mutazioni del mtDNA possono essere identificate molto più facilmente rispetto a mutazioni del DNA nucleare se il materiale di partenza è rappresentato da tessuti microdissezionati dove sono disponibili poche cellule, il cui DNA è stato frammentato dal trattamento di fissazione con formalina. Proprio per la disponibilità di un numero più elevato di sequenze bersaglio rispetto al DNA nucleare, a parità del numero di cellule raccolte, si possono ottenere frammenti sufficientemente lunghi in PCR (circa 600 bp), ideali per svolgere indagini di sequenziamento diretto con buona riproducibilità ed efficienza. Ad ogni istotipo è riferibile una sequenza da confermarsi in doppio considerando la possibilità che la *Taq* polimerasi possa commettere errori in amplificazione. Le varie sequenze che si ottengono dai diversi istotipi di ciascun caso devono poi essere allineate tra loro inserendo come riferimento il DNA sequenziato dal tessuto normale e la sequenza depositata in GeneBank di Anderson et Al. ⁽⁵⁴⁾. Questa indagine è velocemente ottenibile tramite l'utilizzo di un software disponibile in rete chiamato ClustalW che viene comunemente utilizzato in genetica di popolazioni dove si vogliono definire distanze genetiche tra vari gruppi. Nel nostro caso si devono valutare le distanze genetiche tra i vari istotipi prelevati da ciascun caso. Vari metodi si sono sviluppati per evidenziare in termini di distanze genetiche le varie mutazioni trovate, e quello del Neighbor joining (NJ) proposto da Saitou e Nei ^(59,60,61,61bis) nel 1987 è quello più usato almeno recentemente. Si può ritenere che esso applichi il principio di evoluzione minima precedentemente sviluppato in cui si cerca di rendere minima la somma delle distanze tra le popolazioni nello spazio dei rami dell'albero. Tuttavia la costruzione di un albero ad evoluzione minima è dispendiosa perché occorre rielaborare ciascun valore S (distanza di ciascun ramo), e il numero delle possibili topologie può essere anche molto elevato. Nel caso del metodo NJ, il valore S non viene rielaborato per tutte le possibili

topologie, ma il tutto viene inserito in un algoritmo che al termine dell'elaborazione computer-assistita permette la raffigurazione di un solo albero "randomizzato". Questo algoritmo è complesso ed è descritto approfonditamente nel lavoro di Kumar. Inoltre il metodo NJ produce un albero senza radice (unrooted) perché non richiede l'assunto di un tasso costante di evoluzione che molto probabilmente non può essere garantito tra i vari tessuti di un tumore. Altri metodi alternativi di valutazione di distanza genetica come ad esempio UPGMA necessitano di un tasso di mutazione costante nel tempo tra linee evolutive per cui non sono da considerare idonei per questa applicazione. A questo proposito non possiamo assumere che il tasso di mutazione sia identico tra tessuti diversi seppure dello stesso organo perché esiste la possibilità che siano sottoposti ad agenti mutageni diversi o a diverse concentrazioni degli stessi nel corso del tempo.

Il software MEGA descritto nei materiali e metodi riesce a raffigurare l'albero ottenuto dall'algoritmo in base alla distanza genetica tra istotipi.

Il test della bontà di un albero filogenetico è un problema statistico delicato: le frequenze geniche non soddisfano le condizioni di normalità con una varianza costante, e la natura di un albero è così diversa da quella di altri modelli statistici che non consente di applicare concetti classici come l'errore standard o gli intervalli di confidenza. Il metodo più soddisfacente oggi disponibile per saggiare gli effetti dell'errore di campionamento sull'inferenza di un albero è l'analisi chiamata *bootstrap* ^(61 bis). Essa si basa sul ricampionamento con possibilità di replica della matrice originale dei dati: generando un campione casuale dei loci utilizzati, si può ottenere una matrice dei dati, la quale va considerata come un campionamento indipendente degli stessi dati: in pratica si estrae un campione casuale dalla matrice originale dei dati (frequenze geniche per popolazioni), sostituendo alcuni loci e creando una nuova matrice, nella quale alcuni loci compaiono una sola volta, altri due o più volte, e parecchi circa un terzo sono scomparsi del tutto. Dopo ciascun ricampionamento della matrice, il numero totale dei loci resta uguale a quello originale, e le popolazioni rimangono esattamente le stesse. Il numero di ripetizioni del procedimento dipende dalla velocità del calcolatore disponibile; in genere sono sufficienti 50 o 100 ripetizioni. Su ogni nuova matrice generata a partire da quella originale viene ripetuta la

ricostruzione dell'albero, o qualunque altro tipo di analisi si desidera effettuare. Feselstein ^(61 bis), ha introdotto l'uso del procedimento di bootstrap per saggiare la stabilità dei nodi di diramazione di un albero: si valuta la frequenza con la quale lo stesso nodo riappare nei campioni indipendenti ricampionati mediante il bootstrap, e dal numero totale dei ricampionamenti si può ottenere facilmente l'errore standard di questa frequenza. Tuttavia non ci si può aspettare che essa sia molto alta, nel caso di un albero con molte popolazioni, e non sarebbe realistico pensare che possa raggiungere livelli comunemente usati nei test di significatività (95% o 99%).

5.3. CGH:Analisi della regione D-loop (Displacement-loop) mitocondriale (Figura 6)

L'analisi delle sequenze mtDNA D-loop sono state valutate amplificando 4 segmenti di circa 300 bp che coprono l'intera regione in posizione 16024 attraverso la posizione, 576 come descritto nel Human datbank da Anderson and Colleghi ⁽⁵⁴⁾ (MITOMAP: a Human Mitochondrial Genome Database. Center for Molecular Medicine, Emory University, Atlanta, GA.

In questo studio sono stati usati i seguenti i seguenti Primers:

Primer1: 5'-CTCCATGCATTTGGTATTTTCGTCTGG-3' (posizione 41),

Primer2: 5'-GTTTATGGGGTGATGTGAGCCCGTCTA-3', (posizione 648),

primer 3: TGAAATCAATATCCCGCACA, (posizione 16415),

primer4: GGATGAGGCAGGAATCAAAG, (posizione 149)

primer5: GAGCTCTCCATGCATTTGGT, (posizione 36)

primer6: TGGTTAGGCTGGTGTAGGG, (posizione 390)

primer7: CCCTAACACCAGCCTAACCA, (posizione 371)

primer8: AGGGTGAAC TCACTGGAACG (posizione 729).

Questi primer sono stati selezionati in modo tale da evitare l'amplificazione di pseudogeni del genoma nucleare ^(60,61). Le reazioni di PCR sono state effettuate in un volume di 25 µl contenenti: 10 pmoli di ciascun primers, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 10 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl₂, 200 µmol/L dNTPs (dTTP, dCTP, dATP, dGTP), 1X GC rich solution (Roche Applied

Science, Mannheim Germany) e 1.25 U di FastStart Taq DNA polymerase (Roche). Il profilo termico è stato il seguente: 4 minuti a 95°C, 30 secondi a 95°C, 30 secondi a 57°C per 45 secondi, e 45 secondi a 72°C per un totale di 40 cicli in un thermal cycler MJ PTC-100 (MJ Research, Inc. Watertown, MA). I frammenti di PCR ottenuti sono stati verificati tramite elettroforesi orizzontale su gel d'agarosio al 3%. Successivamente i prodotti di PCR sono stati purificati con biglie magnetiche (Agencourt, USA). Il sequenziamento diretto è stato effettuato tramite il kit DTCS-Quick (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA). I marcati sono stati purificati tramite biglie magnetiche (CleanSeq, Agencourt, USA) e fatti correre nel sequenziatore automatico CEQ2000 XL (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA). Sono stati analizzati entrambi i filamenti.

Gli alberi filogenetici e il cluster analysis sono stati create usando il software MEGA 3.1 usando il metodo del "neighbor joining(NJ) con i parametri di Kimura-2. Ciascun albero filogenetico è stato testato usando il metodo di Bootstrap method.

aCGH:

Il cariotipo molecolare è stato ottenuto in tutte le pazienti utilizzando la piattaforma Agilent Technologies Array CGH Kits (Santa Clara, CA) che consente di arrivare a una risoluzione di circa ~100 kb (kit 44B). In breve, il DNA micro dissezionato è stato estratto e amplificato utilizzando il kit WGA (Sigma) e marcato con il kit aCGH random priming labeling kit (Agilent Technologies) usando Cy5-dUTP per le lesioni e Cy3-dUTP per il DNA normale di riferimento (Promega). I campioni marcati sono stati purificati su colonne Qiagen e ibridati a 65°C su vetrini Agilent insieme a 50 µg di DNA Cot-1 per 24 ore. Sono stati effettuati due lavaggi con SSPE 0.1% e il vetrino è stato letto allo scanner confocale Agilent. I dati sono stati poi elaborati usando il software Feature Extraction V.9.1. coadiuvato dal software CGH Analytics V.3.4.27 al fine di valutare eventuali delezioni o amplificazioni identificate. I dati ottenuti sono stati resi disponibili graficamente attraverso un'analisi di clustering gerarchico grazie al web tool Expression Profiler .

Figura 5: CGH Microarray

Microarray CGH: test for deletion and amplification of genomic nuclear DNA

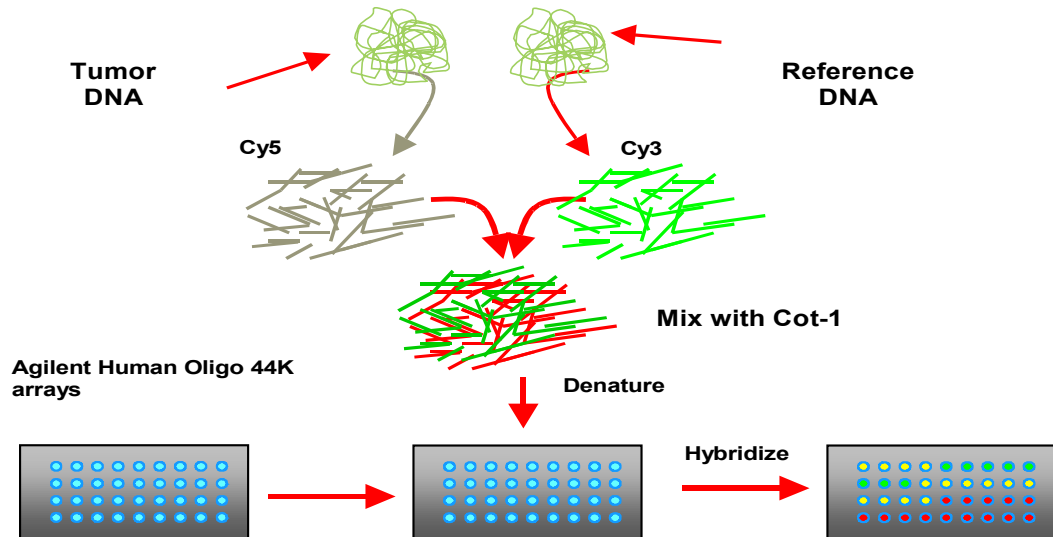
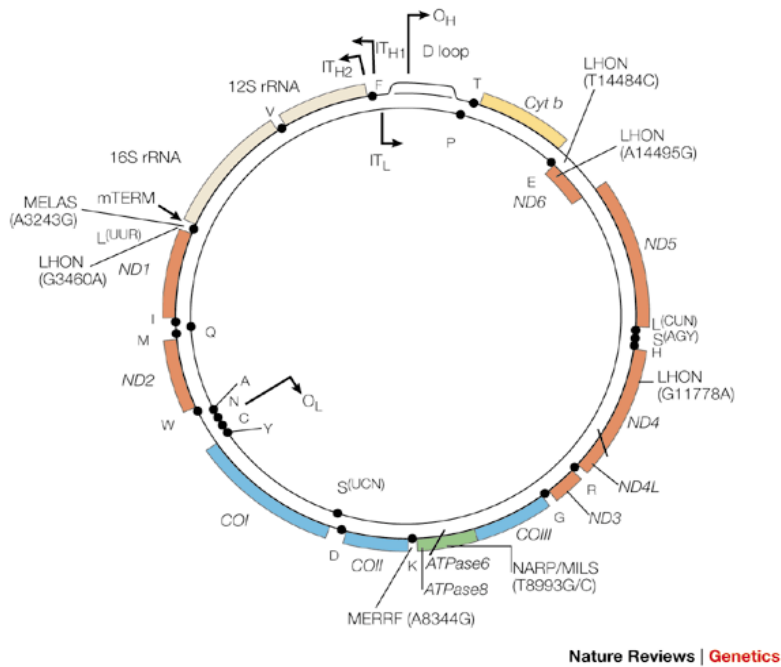


Figura 6: Analisi DNA mitocondriale: sequenza regione D-loop



Nature Reviews | Genetics

6.0 RISULTATI

Forme Duttali: sono state esaminate 46 macrosezioni di mastectomie.

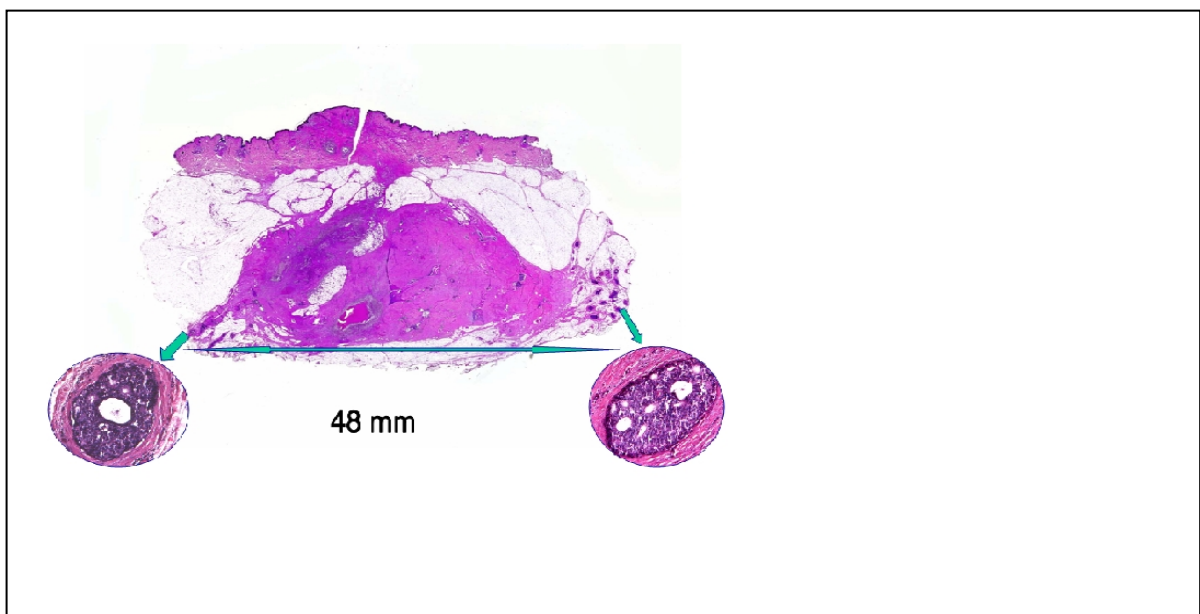
Di queste: 38 casi di CDI associato a CDIS; 4 casi di CDI ; 4 casi di CDIS puro.

CDIS ben differenziato (grado 1): (8 casi). Il numero di foci è compreso tra 1 e 100. 6/8 casi (cioè il 75%) hanno più di 20 foci. La distanza massima tra i foci è compresa tra 24 e 55mm, con una distanza media di 40.86mm. 8/8 casi presentano una distanza massima tra i foci superiore a 20mm. Il CDI era associato in 5 casi ed era di grado 1 e grado 2.

CDIS moderatamente differenziato (grado 2): (22) casi. Il numero di foci è compreso tra 1 e 100. 6/22 casi (cioè il 27%) hanno più di 20 foci. La distanza massima tra i foci è compresa tra 1 e 72mm con una distanza media di 17.15mm. 6/22 casi presentano una distanza massima tra i foci superiore a 20mm. Il CDI era associato in 21 casi ed era di grado 2.

CDIS poco differenziato (grado 3): (14 casi). Il numero di foci è compreso tra 1 e 100. 4/14 casi (cioè il 28.5%) hanno più di 20 foci. La distanza massima tra i foci è compresa tra 1 e 51 mm con una media di 20.5mm. 5/14 casi presentano una distanza massima tra i foci superiore a 20mm. Il CDI era associato in 12 casi ed era di grado 3.

Figura7: Distanza fra due foci di DCIS



CDI multiplo: 5 casi presentavano foci multipli di CDI. Di questi, 1/5 presenta due aree di CDI grado 2 associate a CDIS grado 1. La distanza massima tra le due aree è di 40mm. 4/5 casi presentano invasione vascolare. (Figura 8)

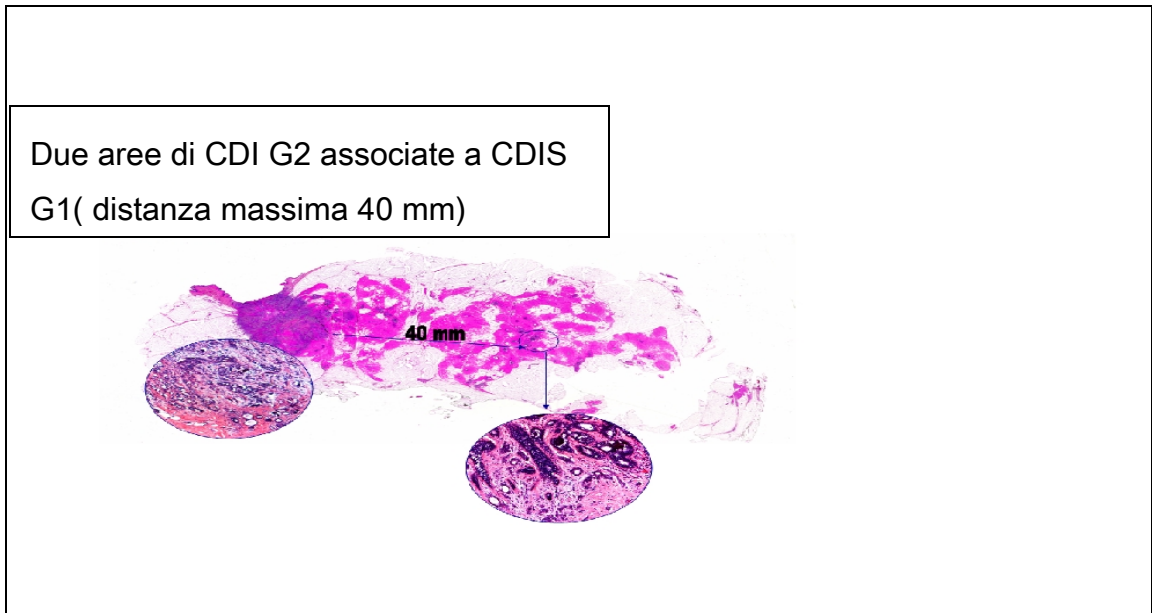


Figura 8

Nella Tabella 6 sono descritti i dati ottenuti nei tre tipi di CDIS confrontati con i CLIS/NL, questi ultimi dati desunti da un precedente lavoro dello stesso gruppo i cui dati erano stati ottenuti con metodiche identiche⁽⁸⁵⁾.

Tabella 6: Paragone fra i tre tipi di DCIS e i LCIS/LN .

Tipo	N. casi	N. Foci (range)	Media	>20 Foci	D. Media mm	Range	D>20mm
NL/ CLIS	13	2-77	27.12	6/13 (46%)	37.9	5-112	9/13 (69.23%)
CDIS Gr 1	8	1>100	56.75	6/8 (75%)	40.86	24-55	8/8 (100%)
CDIS Gr 2	22	1>100	21.14	6/22 (27%)	17.15	1-72	6/22 (27%)
CDIS Gr 3	14	1>100	21.28	4/14 28.5%)	20.5	1-51	5/14 (35.7%)

Ricostruzione tridimensionale.

Sono stati diafanizzati 10 casi. (Figura 9)

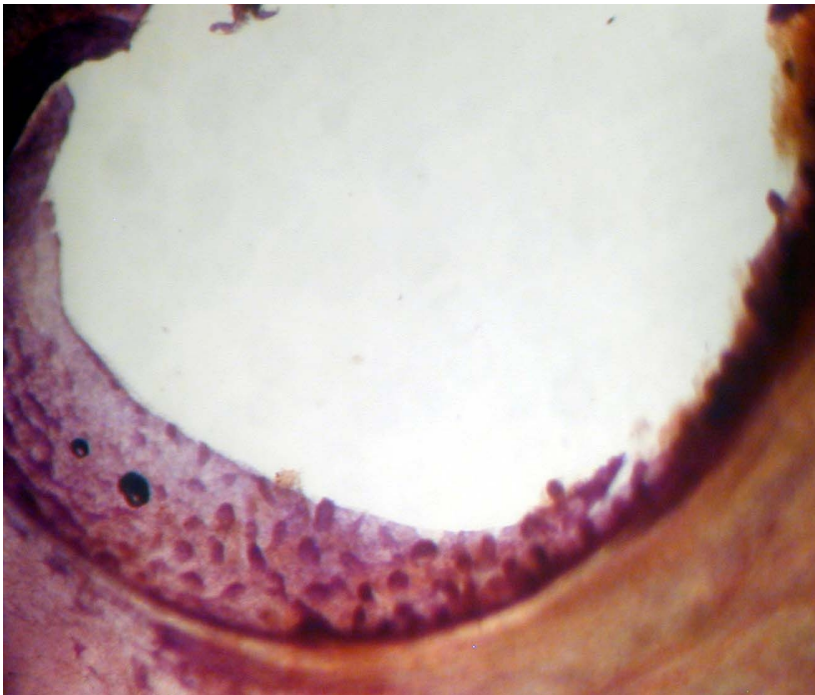
CDIS grado 1: La crescita neoplastica all'interno del dotto non è continua.

CDIS grado 3: Si osserva una crescita neoplastica continua che occlude completamente il lume del dotto e si estende ai lobuli adiacenti.

CDI: Il caso diafanizzato ha presentato una crescita neoplastica confinata all'area di un singolo dotto.

CLIS/CLI: Il CLI si presenta come aree bluastre, a margini sfumati, all'interno delle quali erano visibili aree di CLIS/NL.

Figura 9: CDIS ben differenziato in 3D



Studio genetico nei Ca duttali in situ ed invasivi

di CDIS di G1, G2.

E' stata valutata la correlazione genetica tra i focolai in funzione alla loro distanza: nei *CDIS G1* con focolai a distanza maggiore di 30 mm, si sono osservate differenze nel mtDNA (4 casi:1-2-3-4); mentre in un caso (n.5) vi

erano differenze di mtDNA anche se la distanza dei focolai era inferiore a 12 mm .

CDIS G2 in 3 casi (n. 6-7-8) il mtDNA si è rivelato simili quando i focolai erano ad una distanza tra 11-72 mm; mentre in 2 casi (n. 9-10) con focolai ad una distanza di 26-40 mm il mtDNA è risultato differente.

Analisi degli stessi casi mediante CGH:

CDIS G1: nei casi 1,2 e 3 dove i focolai erano separati da una distanza > 48 mm presentavano differenze genomiche nucleari. Al contrario i casi 4 e 5 con focolai ad una distanza di 12 e 30 mm sono risultati con caratteristiche genomiche simili.

CDIS G2: nel caso 6 e 7 con focolai ad una distanza tra 35-72 mm, presentavano alterazioni genetiche comuni, mentre i casi 8-9-10 con focolai ad una distanza rispettivamente di 11, 26 e 40 mm presentavano differenze del profilo genomico. L'analisi dei risultati ottenuti con mtDNA e CGH hanno mostrato risultati concordanti in 5 casi (3 DCIS G1 e 2 DCIS G2) con caratteristiche clonali differenti, mentre 2 casi (DCIS G2) mostravano una identica clonalità.

Dati discordanti sono stati osservati in 3 casi, 2 casi di DCIS G1 con focolai ad una distanza rispettivamente di 30 e 12 mm, hanno presentato un diverso mtDNA, ma simile profilo genomico; l'altro caso di DCIS G2 con distanza di 11 mm mostrava caratteristiche contrarie, in particolare mtDNAmit. Simile , ma aspetto genomico differente. (Tabella 7)

Tabella 7: Correlazione tra mtDNA e aCGH e distanza dei focolai nei Cauduttali

CASO/Grado	MASSIMA DISTANZA	mtDNA	aCGH
Caso1/ G1	48 mm	DIFFERENTE	DIFFERENTE
Caso2/ G1	50 mm	DIFFERENTE	DIFFERENTE
Caso3/ G1	55 mm	DIFFERENTE	DIFFERENTE
Caso4/ G1	30 mm	DIFFERENTE	SIMILE
Caso5/ G1	12 mm	DIFFERENTE	SIMILE
Caso6/G2	72 mm	SIMILE	SIMILE
Caso7/G2	35 mm	SIMILE	SIMILE
Caso8/G2	11 mm	SIMILE	DIFFERENTE
Caso9/G2	40 mm	DIFFERENTE	DIFFERENTE
Caso10/G2	26 mm	DIFFERENTE	DIFFERENTE

Forme lobulari

CLI & CLIS/NL

I dati ottenuti sui CDI\CDIS sono stati confrontati con una casistica precedentemente studiata di CLI /CLIS (Tabella 8) dallo stesso gruppo e con le stesse metodiche ⁽⁸⁷⁾.

CLIS/NL: 13 casi di neoplasia lobulare (NL). Il numero di foci di CLIS/NL era compreso tra 2 e 77 mm. Sei su 13 casi (cioè il 46%) avevano più di 20 foci di CLIS. La distanza massima tra i foci di CLIS/NL era compresa tra 5 e 112 mm, con una distanza media di 37.9 mm. Mentre in 9/13 casi (cioè il 69%) erano presenti ad una distanza massima tra i focolai superiore a 20mm.

CLIS/CLI: 184/234 foci di NL (cioè il 78.6%) erano contenuti all'interno di aree di CLI.

CLI: le aree multiple di CLI erano comprese tra 1 e 100 mm, con un valore medio di 20.7 mm. La distanza massima tra queste aree era compresa tra 10 e 130 mm., inoltre è stata osservata invasione vascolare.

Relazione tra focolai di NL ed aree di Ca lobulare invasivo (CLI): in 10 casi i focolai di NL erano localizzati all'interno di una ampia area di ca lobulare invasivo, ma in 5 di questi casi alcuni focolai di NL erano lontani dall'area di CLI. Al contrario in 9 casi con aree di CLI lontane rispetto al focolaio più grande non contenevano focolai di NL. In diversi casi le aree riscontrate erano diffuse nel tessuto mammario, ed erano più frequentemente di ampie dimensioni

Quando vi erano aree multiple di CLI è stato osservato in 7 casi associazione ad invasione vascolare o invasione dei canali di Hartveit (3).

Nella tabella 8 vengono riportati i risultati ottenuti in 15 pazienti, 11 sottoposte a mastectomia radicale per neoplasia, 1 caso sottoposta a mastectomia radicale dx e mastectomia profilattica sx e gli altri 2 casi ad intervento conservativo di quadrantectomia.

In 8 pazienti la forma invasiva era rappresentata da carcinoma lobulare di tipo pleomorfo, mentre in 6 pazienti era di tipo classico.

Tabella 8: analisi dei focolai di neoplasia lobulare in situ ed invasivo

NL N°foci	NL Dist mm	CLI N°foci	CLI Dist. mm	CLI Area mm	NL in CLI
49	60	4	15	47	39
9	32	19	67	20	4
77	112	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-
21	44	2	10	38	10
27	32	1	0	10	15
5	22	>100	50	-	5
3	24	1	0	30	3
2	5	>100	130	70	2
3	12	9	85	68	3
49	44	2	13	40	49
2	17	21	55	30	2
50	36	4	70	40	38
-	-	19	64	16	0
14	15	1	0	45	14
-	-	8	82	21	-

Studio genetico NL/CLIS - Ca lobulare invasivo

E' stato inoltre analizzato la correlazione genetica tra la neoplasia lobulare e CLI per verificare se la neoplasia lobulare rappresenti un fattore di rischio o un precursore di una forma lobulare invasiva.

Sono stati quindi studiati 12 casi di NL e CLI presenti contemporaneamente nelle stesse aree ed è stata valutata la clonalità mediante microdissezione per lo studio del DNA mitocondriale e le sequenze D-loop.

Lo studio comparativo di ibridizzazione genomica (CGH) eseguito in 8 casi ha mostrato in tutti i casi la perdita dell'eterozigosità e il loco 16q22. Mediante lo studio mtDNA è stata dimostrata corrispondenza genetica di tipo clonale tra forme in situ ed invasive.

In 7/8 casi è stata inoltre evidenziata una correlazione clonale anche mediante CGH array. Pertanto viene concluso che nei casi analizzati NL e Ca lobulare invasivo sono geneticamente correlati nella maggior parte dei casi. E quindi il NL rappresenterebbe un precursore della forma invasiva.

7.0 DISCUSSIONE

Le macrosezioni consentono un'accurata valutazione dei margini di resezione e permettono il confronto con le immagini radiografiche. Nel nostro studio, le macrosezioni ci hanno permesso una migliore valutazione dell'estensione della lesione in situ e della relazione tra la componente in situ e la componente invasiva della neoplasia.

I dati ottenuti indicano che il CDIS mediamente differenziato (grado 2) e il CDIS poco differenziato (grado 3) sono lesioni ragionevolmente localizzate, estendendosi entro un'area in media di circa 22 mm.

Invece, il CDIS ben differenziato (grado 1) e il CLIS si estendono mediamente entro un'area di ampiezza maggiore e sovrapponibile. Il primo entro 41mm circa, Il secondo entro 30mm circa. Si tratta verosimilmente di una vera multicentricità.

I risultati ottenuti, separano quindi due gruppi di lesioni, CDIS ben differenziato e CLIS\NL da un lato, CDIS moderatamente e scarsamente differenziato dall'altro.

La separazione di questi due gruppi è confermata da dati molecolari precedentemente pubblicati che evidenziano differenze molecolari tra il CDIS ben differenziato e il CDIS poco differenziato, mentre il CDIS ben differenziato e il CLIS\NL condividono alcune caratteristiche molecolari.

Il CDIS ben differenziato presenta solo nel 10% dei casi amplificazione\sovraespressione di HER2; amplificazioni di c-MYC e mutazioni della Ciclina D1; mentre la perdita di eterozigosi del cromosoma 16 è presente nel 70% dei casi ⁽¹⁹⁾.

Al contrario, il CDIS poco differenziato presenta l'amplificazione di HER2 nel 40% dei casi; mutazioni di p-53 nel 60-80% dei casi; amplificazioni di c-MYC e mutazioni della Ciclina D1 nel 35% dei casi; la perdita di eterozigosi del cromosoma 16 nel 40% dei casi. Infine traslocazioni in 17q e 8q e perdite in 11q e 13q ricorrono nel 30-50% dei casi di CDIS poco differenziato, mentre sono infrequenti nel CDIS ben differenziato.

Sebbene ci sono pochi studi molecolari sul CLIS/NL, questi tendono ad indicare alcune caratteristiche molecolari comuni al CDIS ben differenziato.

La più rappresentata è la perdita del 16q, che è molto frequente sia nel CLIS/NL sia nel CDIS ben differenziato. Al contrario la perdita del 16q è rara nel CDIS poco differenziato.

La ricostruzione 3D ci permette uno studio a tre dimensioni dell'anatomia mammaria, dello sviluppo delle ghiandola mammaria nell'infanzia-maturazione puberale- adulto. Infine, la ricostruzione 3D permette di studiare nelle tre dimensioni il tessuto mammario adiacente al carcinoma invasivo e così fornisce dati importanti riguardo la multicentricità e la multifocalità della neoplasia. La ricostruzione 3D visualizza il tipo di crescita del CDIS.

La ricostruzione 3D ha confermato i dati della letteratura evidenziando che il CDIS di basso grado prolifera in maniera discontinua lungo il sistema duttale. Al contrario, il CDIS di alto grado cresce in maniera continua lungo il sistema duttale.

Relazione Ca in situ infiltrante. Il CDIS grado 2\3 è un precursore del CDI, poichè da studi di follow-up si vede che l'evoluzione si verifica nel 32% dei casi ⁽¹⁹⁾. In questo studio si conferma tale relazione in quanto le lesioni di CDIS grado 2-3 erano associate al CDI rispettivamente nel 95.5% e nel 85.70 %.

La relazione tra CDIS grado 1 e CDI non è altrettanto definita.

Analogamente la relazione tra CLIS/NL e CLI non è ben definita.

Nella casistica presente, la maggior parte dei foci di CLIS\NL (il 78.6%) è contenuto all'interno della neoplasia invasiva. E' un'associazione molto rilevante ed è possibile non si tratti di un fenomeno fortuito.

Multicentricità: Il CDI quando multicentrico era correlato ad infiltrazione vascolare. In un solo caso erano presenti due foci distinti di CDI vicini a foci distinti di CDIS ben differenziato.

Al contrario CDIS ben differenziato e CLIS/LN possono avere foci molto distanti e quindi essere i veri multicentrici.

Il carcinoma lobulare in situ è conosciuto da molti anni ed è stato considerato molto simile al Ca duttale in situ ⁽¹³⁾.

Originariamente è stato descritto come ben differenziato con nuclei monomorfi. Tuttavia recentemente sono stati descritte forme poco differenziate con nuclei pleomorfi (Carcinomi lobulari in situ pleomorfi PLCIS)⁽¹⁰⁰⁾ con caratteristiche simili ai CDIS poco differenziati. Inoltre così come nei CDIS anche nei Ca lobulari in situ è stato descritto differenziazione cellulare neuroendocrina, apocrina, mucinosa e mioepiteliale^(101,102,103,104).

Vi è consenso generale che l'iperplasia duttale atipica, così come definita dalla OMS, rappresenti un precursore della forma duttale invasiva^(105,5).

Al contrario nelle NL non appare chiaro se rappresentino un fattore di rischio o se siano lesioni precursori di carcinoma invasivo⁽⁵⁾.

La caratteristica multifocalità e bilateralità di queste lesioni porterebbe a considerarlo un fattore di rischio⁽¹⁰⁶⁾.

Questo viene dimostrato da una meta-analisi di 9 centri nella quale è stato osservato che la forma invasiva si sviluppa nel 15,1% delle pazienti precedentemente sottoposte ad escissione. Nello stesso studio il 9,3% delle pazienti hanno sviluppato un carcinoma invasivo controlaterale⁽¹⁰⁷⁾. In un altro studio di più di 1.100 pazienti circa il 15% delle pazienti sottoposte ad escissione di NL hanno sviluppato successivamente una forma infiltrante; di quest'ultimi l'8,7% era ipsilaterale, mentre nel 6,7% si è verificato nella mammella controlaterale⁽¹⁰⁸⁾. Altri studi, come quello di Ottesen, che sostiene che il NL sia da considerarsi una lesione precancerosa e la comparsa di CLI controlaterale sarebbe correlabile all'aumentato fattore di rischio in presenza di NL. Nelle pazienti con diagnosi di carcinoma invasivo a carico della mammella omolaterale era associato nel 68% dei casi ad iperplasia lobulare atipica, mentre nella mammella controlaterale il 24% delle pazienti (come studiato da Page) presentava iperplasia lobulare atipica che era considerata come fattore di rischio intermedio tra il precursore locale e il fattore di rischio generale per entrambe le mammelle.

Vi sono comunque dati contrastanti infatti alcuni studi mostrano che il 50% dei carcinomi invasivi associati a NL sono forme duttali e non di tipo lobulare.

Nello studio effettuato presso Anatomia Patologica Osp. Bellaria su macrosezioni è stata dimostrata una significativa correlazione tra NL e CLI⁽⁸⁵⁾.

La relazione genetica nei casi di NL sincrono a CLI valutati mediante mtDNA e CGH (ibridizzazione genomica) suggerisce che nella maggior dei casi vi sia una correlazione clonale.

8.0 CONCLUSIONI

Questo studio ha mostrato come i CDIS ben differenziati e CLIS/NL si presentano più spesso con caratteristiche di multicentricità. Tale caratteristica è meno frequente nei DCIS G2 e G3, che sono considerati a crescita continua e probabilmente hanno una insorgenza unilobare.

Le forme duttali in situ di G2 e G3 rappresentano un precursore della forma invasiva nel 32% dei casi. Nell'analisi dei nostri casi le lesioni in situ di G2 e G3 erano associate alla forma invasiva nel 95,5% e nel 85,70 % rispettivamente.

La relazione tra CDIS G1 e forma invasiva non appare ben definita.

L'analisi genetica ha mostrato che focolai di DCIS ad una distanza maggiore di 35 mm sono geneticamente differenti; Non è stata evidenziata relazione genetica tra focolaio di carcinoma duttale invasivo e focolai di DCIS, questo risultato è difficile da spiegare e probabilmente è da correlare ad una elevata instabilità genetica nei tumori invasivi.

La NL si presenta multicentrica assai spesso, ed è risultata dai nostri dati correlata geneticamente con la forma invasiva nella maggior parte dei casi.

Inoltre è stato osservato nei casi di CLI di tipo pleomorfo (8 casi) la media del numero di aree invasive per caso era pari a 32, mentre nei 6 casi di CLI di tipo classico il numero medio di aree invasive per caso era pari a 5.

Questa osservazione ci suggerisce che il CLI di tipo pleomorfo rappresenta una neoplasia ad elevata aggressività e va distinta dal carcinoma lobulare invasivo di tipo classico.

Dal punto di vista genetico esiste clonalità tra le forme lobulari in situ e le forme invasive.

L'estensione della malattia nel carcinoma mammario potrebbe essere definita come un'area che include tutte le lesioni osservate e coincida esattamente con l'area delimitata dai confini del lobo malato. La multicentricità del carcinoma mammario potrebbe ridefinirsi come presenza di due o più lobi malati e la multifocalità come presenza di più di un focus tumorale all'interno del lobo malato.

Appare quindi proponibile nelle pazienti a basso rischio di multicentricità interventi chirurgici ancora più conservativi associati a trattamento radiante

adiuvante sul letto chirurgico con la finalità di escissione o distruzione dell'intero lobo malato e con conseguente buon risultato oncologico.

In particolare, nei CDIS G2 e G3 , nei CDI grado 2&3 e nei CLI di tipo classico appare ragionevole proporre una radioterapia ad un volume di ghiandola residua più limitati, in particolare al tessuto circostante la zona di intervento, che rappresenta la sede a più elevato rischio di recidiva.

I diversi studi in corso di irradiazione parziale probabilmente porteranno a modificare l'approccio terapeutico adjuvante locale delle pazienti con neoplasia in stadio iniziale e in assenza di caratteristiche di multicentricità.

Bibliografia

1. Wellings SR, Jensen HM: On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. *J Nat Cancer Inst* 1973;50:1111-1118.
2. Toker C: Clear cells of the nipple epidermis. *Cancer* 1970;25:601-610.
3. Hartveit F: Attenuated cells in breast stroma: the missing lymphatic system of the breast. *Histopathology* 1990;16:533-543.
4. Damiani S. and Eusebi V: Gross and microscopic pathology. In: Donegan WL, Spratt JS eds. *Cancer of the breast*. Philadelphia: Saunders, 2002: 347-375.
5. WHO. Tumors of the breast and female genital organs. Tavassoli, F. A. and Devilee, P. 3rd(5th).2003. IARC Press, Lyon. WHO classification of tumours. Kleihues, P. and Sobin, L.
6. Lakhani SR, Collins N, Stratton MR, et al.: Atypical ductal hyperplasia of the breast: clonal proliferation with loss heterozygosity on chromosomes 16q and 17p. *J Clin Path* 1995;48:611-615.
7. Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, et al. : Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Nat Cancer Inst* 1998;90:1138-1145.
8. Sugg SL and Donegan WL: Staging and prognosis. In: Donegan WL, Spratt JS eds. *Cancer of the breast*. Philadelphia: Saunders, 2002:477-506.
9. Tot T, Tabar L, Dean PB: The pressing need for better histologic-mammographic correlation of the many variations in normal breast anatomy. *Virchows Arch* 2000;437:338-344.
10. Holland R and Jan H. C. L. Hendriks.: Microcalcifications associated with ductal carcinoma in situ: mammographic-pathologic correlation. *Seminars in Diagnostic Pathology*, VOL 11, NO 3 (AUGUST) 1994:pp181-192.

11. Foschini MP, Fornelli A, Peterse JL, et al.: Microcalcifications in ductal carcinoma in situ of the breast. *Hum Pathol* 1996;27:178-183.
12. Faverly D, Burgers L, Bult P, et al.: Three dimensional imaging of mammary ductal carcinoma in situ: clinical implications. *Sem Diagn Pathol* 1994;11:193-198.
13. Foote FW, Stewart FW: Lobular carcinoma in situ. *American Journal of Pathology* 1941;17:491-500.
14. Vos CB, Cleton-Jansen AM, Berx G: E-cadherin inactivation in lobular carcinoma in situ of the breast: an early event in tumorigenesis. *Br J Cancer* 1997;76:1131-1133.
15. Azzopardi J G, Ahmed A and Millis R R.: Problems in breast pathology. London, W.B Saunders Company, 1979.
16. Eusebi V, Magalhaes F, Azzopardi JG: Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: an aggressive tumor showing apocrine differentiation. *Hum Pathol* 1992;23:655-662.
17. Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer. 1. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19:403-410.
18. AJCC: Cancer staging manual. 6. New York, Springer, 2002.
19. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew NM, et al.: American joint committee on cancer prognostic consensus conference. *Cancer* 2000;88:1739-1757.
20. Dionigi Renzo.: Trattato di Chirurgia Generale. Edizione 2002. Casa Editrice MASSON.
21. Silverstein Mj, Barth A, A Poller et al.: Ten-year results comparing mastectomy to excision and radiation therapy for ductal carcinoma in situ of breast. *Eur J Cancer*; 31: 1425-1427, 1995
22. Schnitt SJ, Harris JR, Smith BL: Developing a prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast: are we there yet? *Cancer*; 11: 2189-2192, 1996
23. Silverstein MJ, Lagios MD, Craig PH, et al: A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer*; 77:2267-2274, 1996

24. Silverstein MJ: Ductal carcinoma in situ of the breast. Baltimore: Williams e Wilkins Ed., 1997
25. Boyages J, Delaney G, Taylor R: Predictors of local recurrence after treatment of ductal carcinoma in situ. A meta-analysis. *Cancer*,85: 616-628, 1999
26. EL-Sharkawi A, Waters JS: The place for conservative treatment in the management of Paget's disease of the breast. *Eur J Surg Oncol*; 18: 301-303, 1992
27. Sarrazin D, Le MG, Arriagada R et al. : Ten year results of a randomized trial comparing a conservative treatment mastectomy in early breast cancer. *Radioth Oncol*; 14: 177-184, 1989
28. Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS et al.: Meeting highlights: update international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21 3357-65
29. Royal College of Radiologists Clinical Oncology Information Network: Guidelines on the non surgical management of breast cancer. COIN Breast Cancer Working Group. Version 1.0 January 1999
30. Poortmans Ph. Evidence based radiation oncology: Breast Cancer. *Radiotherapy and Oncology* 2007; 84: 84-101
31. Fisher B, Anderson S, Bryant J et al: Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347(16): 1233-41
32. Morrow M, White J, Moughan J et al: Factors predicting the use of breast conserving therapy in stage I and II breast carcinoma. *J Clin Oncol* 2001; 19(8): 2254-62
33. Whelan T, Mackenzie et al: Randomized trial of breast irradiation schedules after lumpectomy for women with lymphonode negative breast cancer. *J of National cancer Instiute*, Vol.94 N° 15, 1143-1150, August 7, 2002
34. Veronesi U, Cascinelli N et al.: Twenty follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engj J Med*. 2002; 347(16): 1227-32

35. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. Favourable and unfavourable on long term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomized. *Lancet* 2000; 355: 1757-1770
36. Fisher ER, Anderson S, Tan-Chiu E et al.: Fifteen-year prognostic discriminants for invasive breast carcinoma: National Surgical Adjuvant Breast Bowel Project Protocol -06 *Cancer*; 2001; 91(8 Suppl.): 1679-1687
37. Veronesi U, Marubini E et al. : Breast conserving surgery with or without postoperative radiotherapy. Long term results of randomized trial. *Ann Oncol* 2001, 12: 997-1003
38. Kurtz J for the EUSOMA Working Party. Position Paper. EUSOMA Guidelines. The curative role of radiotherapy in the treatment of operable breast cancer. *Eur J Cancer* 2002 ; 38 :1961–1974
39. Clinical practice guidelines for the management of early breast cancer : Second Edition (2000) NHMRC Australia
40. Schnitt SJ, Abner A et al: The relationship between positive microscopic margins and risk of local recurrence in patients with breast cancer treated with breast conserving surgery and radiation therapy. *Cancer* 74: 1746-1751, 1994
41. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials: Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*; 351: 1451-1467, 1998
42. Effects chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: overview and of the randomized trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet*; 365: 1717. 2005
43. Cronin M, Sangli C et al: Analytical validation of Oncotype DX genomic diagnostic test for recurrence prognosis and therapeutic response prediction in node negative estrogen receptor positive breast cancer. *Clin Chem* 53(6): 1084-1091, 2007
44. Van de Vijver MJ, Yu DH, Van't Veer L et al.: A gene expression signature as predictor of survival in the breast cancer. *N Engl J Med* 347,25:1999-2009, 2002

45. RHRH-anagonit in Early Breast Cancer Overview Group: Use of luteinising-hormone-releasing hormone agonists as adjuvant treatment in premenopausal patients with hormone-receptor positive breast cancer: a meta-analysis of individual patient data from randomized adjuvant trials. *Lancet*; 369: 1711-23, 2007
46. Cates As, Keshaviah A et al.: Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer; update of study BIG 1-98. *J Clin Oncol* 25(5):486-92, 2007
47. French Adjuvant Study Group: Benefit of high- dose epirubicin regime in adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer patients with poor prognostic factor: 5 year follow-up of French Adjuvant Study Group 05 randomized trial. *J Clin Oncol* 19(3):602-11,2001
48. Henderson IC, Berry DA et al.: Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose adjuvant chemotherapy regime for patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol* 21(6): 976-83, 2003
49. Mammounas EP, Bryant J et al.: Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: result NSABP B-28. *J Clin Oncol* 23(16): 3686-96, 2005
50. Piccart-Gbhart MJ, Procter M et al.: Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2 positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1659-72, 2005
51. Romond EH, Perez EA et al.: Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1673-84, 2005
52. Tot T, MD. PhD. :DCIS, cytokeratins and the theory of the sick lobe. Department of Pathology, Central Hospital, Falun, Sweden.
53. Holland R and Faverly DRG.: The local distribution of ductal carcinoma in situ of the breast: whole-organ studies. Section 5: Pathology. Cap 19 .pp 240-247

54. Anderson et al. Nature Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290:457-65
55. Coller HA, Khrapko K, Bodyak ND, Nekhaeva E, Herrero-jmenez P, Thilly WG: High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. *Nature Genetics* 2001; 28; 147-150.
56. Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK et al: Somatic mutations of th Mitochondrial Genome in Human Colorectal Tumors. *Nature Genetics* 1998; 20: 291-293.
57. Richard SM, Bailliet G, Paez GL, Bianchi MS, Peltomaki P, Bianchi NO: Nuclear and Mitochondrial Geneome Instability in Human Breast Cancer. *Cancer Research* 2000; 60, 4231-4237.
58. Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, Wu L, Buta MR, Eleff SM, Jen J, Sidransky D: Facile Detection of Mitochondrial DNA mutations in Tumors and Bodily Fluids. *Science* 2000; 287: 2017-2019.
59. Saitou N, Nei M: The neighbor Joining method: a new method to reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Bio. Evol.* 1987; 4;4: 406-425;
60. Nei, M., S. Kumar, K. Takahashi.: The optimization principle in phylogenetic analysis tends to give incorrect topologies when the number of nucleotides or amino acids used is small. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1998; 95:12390-12397
61. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M: MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 2001;17:1244-5
- 61bis. Feselstein J.: Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap in evolution. 39, pp. 783-791
62. Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, et al.: Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N Engl J Med.* 2002;347(16):1233-41.

63. Morrow M, Strom EA, Bassett LW et al.: Standard for Breast Conservation Therapy in the Management of Invasive Breast Carcinoma. *CA Cancer J Clin* 2002;52:277-300
64. Kuerer HM, Julian TB: Strom EA et al. Accelerated Partial Breast Irradiation After Conservative Surgery for Breast Cancer. *Ann Surg* 2004;239: 338
65. Holland R, Veling SHJ, Mravunac M, et al.: Histologic multifocality of Tis, T1-2 breast carcinomas: Implications for clinical trials of breast conserving surgery. *Cancer* 1985;56:979–990
66. Arthur DW, Vicini FA, Kuske RR et al.: Accelerated partial breast irradiation: an updated report from the American Brachytherapy Society. *Brachytherapy* 2003; 2: 24–130
67. Faverly D, Holland R, Burgers L.: An original stereomicroscopic analysis of the mammary glandular tree. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1992;421:115–119.
68. Faverly D, Burgers L, Bult P, et al.: Three dimensional imaging of mammary ductal carcinoma in situ: clinical implications. *Sem Diagn Pathol* 1994;11:193–198.
69. Imamura H, Haga S, Shimizu T, et al.: Relationship between the morphological and biological characteristics of intraductal components accompanying invasive ductal breast carcinoma and patient age. *Breast Cancer Res Treat* 2000;62:177–184.
70. Ohtake T, Abe R, Kimijima I, et al.: Intraductal extension of primary invasive breast carcinoma treated by breast-conservative surgery. *Cancer* 1995;76:32–45.
71. Foschini MP, Righi A, Cucchi MC, Ragazzini T, Merelli S, Santeramo B, Eusebi V.: The impact of large (macro) sections and 3D technique on the study of lobular in situ and invasive carcinoma of the breast. *Virchows Arch* 2005 :1-6
72. Going JJ, Moffat DF.: Escaping from flatland: clinical and biological aspects of human mammary duct anatomy in three dimensions. *J Pathol* 2004;203:538-544.

73. Morandi L; Marucci G; Foschini MP; Cattani MG; Pession A; Riva C; Eusebi V.: Genetic similarities and differences between lobular in situ neoplasia (LN) and invasive lobular carcinoma of the breast. *Virchows Arch* 2006 449: 14-23
74. Alacios J.: Preinvasive lesions-molecular classification and implications for management. In *Atti del 20mo Congresso Europeo Di Anatomia Patologica, Parigi 2005*. pag 41-42
75. Robbins.: *Le basi patologiche delle malattie*. 6 edizione. Casa Editrice PICCIN
76. Morrow M, White J, Moughan J, Owen J, Pajack T, Sylvester J, Wilson JF, Winchester D. Factors predicting the use of breast-conserving therapy in stage I and II breast carcinoma. *J Clin Oncol* 2001;19(8):2254-62.
77. Bijker N, Rutgers EJ, Duchateau L, et al.: Breast-conserving therapy for Paget disease of the nipple: a prospective European Organization for Research and Treatment of Cancer study of 61 patients. *Cancer*. 2001;91 (3):472-7.
78. Bobrow LG, Happerfield LC, Gregory WM, et al.: The classification of ductal carcinoma in situ and its association with biological markers. *Seminars in Diagnostic Phathology*. 1994;11 (3):199-207.
79. Damiani S, Peterse JL, Eusebi V.: Malignant neoplasms infiltrating "pseudoangiomatous" stromal hyperplasia of the breast: an unrecognized pathway of tumor spread. *Histopathology*. 2002;41:208-15.
80. Elston CW, Ellis IO.: Pathological prognostic factors in breast cancer. 1. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19:403-10.
81. Foschini MP, Tot T, Eusebi V.: Large-section (Macrosection) Histologic Slides. In: Silverstein MJ, ed. *Ductal Carcinoma in situ of the Breast*. Philadelphia: Lippincott; 2002:249-54.

82. Holland R, Peterse JL, Millis RR, et al.: Ductal carcinoma in situ: a proposal for a new classification. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 1994;11 (3):167-80.
83. Lampejo OT, Barnes DM, Smith P, et al.: Evaluation of infiltrating ductal carcinomas with a DCIS component: correlation of the histologic type of the in situ component with grade of the infiltrating component. *Seminars in Diagnostic Pathology*. 1994;11 (3):215-22.
84. Marucci G, Morandi L, Magrini E, et al.: Gene expression profiling in glioblastoma and immunohistochemical evaluation of IGFBP-2 and CDC20 7. *Virchows Arch*. 2008;453:599-609.
85. Morandi L, Marucci G, Foschini MP, et al.: Genetic similarities and differences between lobular in situ neoplasia (LN) and invasive lobular carcinoma of the breast. *Virchows Arch*. 2006;449:14-23.
86. Morandi L, Marucci G, Pession A, et al.: DNA mitocondriale e CGH array in patologia mammaria. *Pathologica*. 2005;97:188-9.
87. Riva C, Dainese E, Caprara G, et al.: Immunohistochemical study of androgen receptors in breast carcinoma. Evidence of their frequent expression in lobular carcinoma. *Virchows Arch*. 2005;447:695-700.
88. Silverstein MJ, Lagios MD, Groshen S, et al.: The influence of margin width on local control of ductal carcinoma in situ of the breast. *The New England Journal of Medicine*. 1999;340:1455-61.
89. Tavassoli FA, Eusebi V.: *Tumors of the breast*. Washington, DC: American Registry of Pathology/AFIP; 2008.
90. Turner RR, Ollila DW, Stern S, et al.: Optimal histopathologic examination of the sentinel lymph node for breast carcinoma staging. *Am J Surg Pathol*. 1999;23:263-7.
91. Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, et al.: Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes. *Lancet*. 1997;349:1864-7.

92. Ribeiro GG, Dunn G, Swindell R, Harris M, Banerjee SS.: Conservation of the breast using two different radiotherapy techniques: Interim report of a clinical trial. *Clinic Oncol (R Coll Radiol)* 1990; 2: 27-34.
93. Baglan KL, Sharpe MB., Jaffray D et al.: Accelerated Partial Breast Irradiation using 3D Conformal Radiation Therapy (3D-CRT). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 55: 302-311.
94. Veronesi U, Orecchia R, Luini A, et al.: A preliminary report of intraoperative radiotherapy (IORT) in limited-stage breast cancer that are conservatively treated. *Eur J Cancer* 2001;37:2178-2183.
95. Fentiman IS, Poole C, Tong D et al.: Iridium implant treatment without external radiotherapy for operable breast cancer. A pilot study. *Eur J Cancer* 1991; 27: 447-450.
96. Fentiman IS, Poole C, Tong D, et al.: Inadequacy of iridium implant as sole radiation treatment for operable breast cancer. *Eur J Cancer* 1996; 32A:608-611.
97. Fisher ER, Anderson S, Tan-Chiu E, et al.: Fifteen-year prognostic discriminants for invasive breast carcinoma: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol-06. *Cancer*. 2001;91(8 Suppl):1679–1687.
98. Veronesi U, Marubini E, Milani A, et al.: Breast conserving surgery with or without postoperative radiotherapy. Long term results of a randomized trial. *Ann Oncol* 2001, 12: 997-1003.
99. Ribeiro GG, Magee B, Swindell R, Harris M, Banerjee SS.: The Christie Hospital breast conservation trial: An update at 8 years from inception. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1993; 5: 278-83.
100. Frost AR, Tsangaris TN, Silverberg SG : Pleomorphic lobular carcinoma in situ : *Pathol Case Rev* 1996 1: 27-31
101. Eusebi V., Azzopardi JC: Lobular endocrine neoplasia in fibroadenoma of the breast. *Histopathology* 1980 4:413-428
102. Eusebi V, Betts CM; Haagensen DE, Gugliotta P, Bussolati G, Azzopardi JG: Apocrine differentiation in lobular carcinoma of the breast. *Hum Pathol* 1984 15: 134-140

103. Gad A, Azzopardi JG: Lobular carcinoma of the breast: a special variant of mucin-secreting carcinoma. *J Clin Pathol* 1975 28: 711-716
104. Soares J, Tomasic G, Bucciarelli E, Eusebi V: Intralobular growth of myoepithelial cell carcinoma of the breast. *Virchows Arch* 1994 425:205-210
105. Eusebi V, Feudale E, Foschini MP, Micheli A, Conti A, Riva C, Di Palma S, Rilke F: Long Term follow-up of i situ carcinoma of the breast. *Semin Diagn Pathol* 1994 11(n3); 223-235
106. Anderson JA: Multicentric and bialteral appearance of lobular carcinoma in situ of the breast. *Acta Pathol Microbil Scand* 1974 82: 730-734
107. Anderson JA: lobular carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 1977 39: 2597-2602
108. Tavassoli FA: Pathology of the breast. Appleton-Lange, Stamford CT 1999

Ringraziamenti

Ringrazio tutti coloro che mi hanno aiutato e supportato per la ricerca del materiale, per il raccoglimento dei dati e per la stesura finale della tesi. In particolare devo ricordare la Prof.ssa Maria Pia Foschini, il Dott. Giovanni Frezza, la Dott.ssa Maria Cristina Cucchi, il Dott. Luca Morandi e la Dott.ssa Federica Flaminio, il personale dell' Anatomia Patologica e Radioterapia dell'Ospedale Bellaria di Bologna per l'insostituibile sostegno che ho da essi ricevuto.

