

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

VALUTAZIONE MOLECOLARE DEL GENE ESR1 TRAMITE BIOPSIA LIQUIDA: ANALISI RETROSPETTIVA DELLA CASISTICA CLINICA

MOLECULAR ASSESSMENT OF THE ESR1 GENE THROUGH LIQUID BIOPSY: RETROSPECTIVE ANALYSIS OF THE CLINICAL CASES

Relatore: Prof.ssa
GOTERI GAIA

Tesi di Laurea di:
BURATTI CORINNA

Correlatore: Dott.ssa
ANTALDI ELENA

Anno Accademico 2025-2026

Sommario

INTRODUZIONE 1
PARTE GENERALE 3
1.1 MAMMELLA 3
1.2 CARCINOMA DELLA MAMMELLA 4
1.2.1 Numeri 4
1.2.2 Fattori di rischio 4
1.2.3 Classificazione 5
1.3 METASTASI NEL CARCINOMA DELLA MAMMELLA 13
1.4 ESTROGENI ED INTERAZIONE CON IL TESSUTO MAMMARIO 15
1.4.1 Estrogeni 15
1.4.2 Aromatasi 17
1.4.3 Estrogeni e tessuto mammario 18
1.5 TERAPIE ENDOCRINE 20
1.5.1 Storia 20
1.5.2 Terapia ormonale e classificazione dei farmaci 21
1.6 ESR1 26
1.6.1 Generale 26
1.6.2 Struttura 26
1.6.3 Meccanismo di attivazione recettoriale 28
1.6.4 Mutazioni 29
1.6.5 Sviluppo e implicazioni 33
1.6.6 Rilevazione 35
1.7 BIOPSIA LIQUIDA 37
1.7.1 Generale 37
1.7.2 Biopsia liquida vs Tessuto 38
1.7.3 Vantaggi 39
1.7.4 Svantaggi 40
1.7.5 Biomarker 40
OBIETTIVO 45
MATERIALI E METODI 46
3.1 CAMPIONI 46
3.1.1 Generale 46
3.1.2 Raccomandazioni per una corretta processazione del campione di sangue 47

3.1.3 Non conformità 49
3.2 PERCORSO ANALITICO 51
3.2.1 Pre-Analitica 51
3.2.2 Analitica 59
3.2.3 Post-Analitica 62
RISULTATI 64
DISCUSSIONE 71
CONCLUSIONI 76
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA 77

INTRODUZIONE

Il carcinoma mammario rappresenta, ad oggi, una delle principali sfide della medicina moderna a causa della sua elevata incidenza, per la complessità biologica che lo caratterizza e i sempre più frequenti casi di recidiva e progressione.

Tra i diversi sottotipi molecolari, quelli che esprimono il recettore per gli estrogeni (ER+) costituiscono la quota più rappresentativa e la loro gestione terapeutica standard si basa da anni sulla modulazione della via estrogenica mediante terapia ormonale. In questo contesto, il gene ESR1, che codifica per il recettore ERα, assume un ruolo centrale: proprio sotto pressione selettiva di questi farmaci, le cellule tumorali sviluppano la capacità di selezionare cloni mutanti per bypassare l'azione dei farmaci rendendo inefficaci terapie consolidate come gli inibitori dell'aromatasi. Una delle cause più rilevanti di questo fenomeno è rappresentata dalle mutazioni attivanti del dominio LBD di ESR1, capaci di rendere il recettore costitutivamente attivo anche in assenza di estrogeni con conseguente attivazione a valle di tutte le sue funzioni.

Parallelamente, l'avvento della biopsia liquida ha rivoluzionato il modo di valutare e monitorare questo processo: l'analisi del DNA tumorale circolante nel campione di sangue permette di monitorare in maniera efficiente i cambiamenti molecolari della neoplasia, con la possibilità di cogliere l'emergere delle mutazioni di ESR1 prima ancora che si manifestino clinicamente. Questo approccio apre la strada a una diagnostica più dinamica, capace di adattarsi ai cambiamenti del tumore nel corso della terapia con, inoltre, la possibilità di diagnosi precoce.

In questo contesto, il presente lavoro si propone di analizzare lo stato mutazionale del gene ESR1 in una coorte di pazienti sottoposte a biopsia liquida, valutando la frequenza, la distribuzione e la prevalenza delle mutazioni identificate, e correlando tali dati con parametri clinici rilevanti. L'obiettivo è duplice: da un lato comprendere la reale rilevanza clinica delle mutazioni di ESR1, dall'altro valutare

la biopsia liquida come metodica innovativa e potenzialmente sostitutiva degli approcci standard nella gestione del carcinoma mammario ER-positivo.

PARTE GENERALE

1.1 MAMMELLA

La mammella è un organo bilaterale ghiandolare che poggia sul muscolo pettorale la cui funzione primaria è la produzione e secrezione del latte per il nutrimento della prole.

È composta, oltre che da tessuto funzionale ghiandolare secretorio, da tessuto adiposo in quantità variabile, tessuto di sostegno e il capezzolo.

Anatomicamente, la ghiandola mammaria è costituita da 15-18 lobi; ciascun lobo presenta più lobuli, costituiti da acini e da dotti galattofori che permettono il riversamento delle secrezioni verso il capezzolo. Il dotto principale si ramifica e nella porzione finale crea l'unità terminale dutto-lobulare (UTDL): quest'ultima è formata dal dotto terminale extralobulare e dal lobulo. È proprio dall'unità terminale dutto-lobulare che si ha l'origine principale di quasi tutte le patologie benigne e maligne della mammella.

Tale struttura risulta essere enormemente sensibile e responsiva alla presenza o assenza di ormoni, caratteristica che ne garantisce le continue modificazioni fisiologiche associate alla produzione ormonale ciclica come gravidanza e menopausa oltre alle modificazioni patologiche ed oncologiche che possono colpire questo distretto.

1.2 CARCINOMA DELLA MAMMELLA

1.2.1 Numeri

Il carcinoma della mammella è il tumore più frequentemente diagnosticato nelle donne in Italia. Secondo i dati *AIOM* [1], nel 2024 sono state stimate all'incirca 53 mila nuove diagnosi con sopravvivenza netta a 5 anni dalla diagnosi dell'88%. Sono 925.000 le donne viventi in Italia dopo una diagnosi di tumore della mammella.

L'incidenza, ovvero il numero di nuovi casi in un periodo di tempo definito, del tumore della mammella è in leggera crescita soprattutto nelle donne più giovani e, nonostante ciò, nelle donne tra i 20 e i 49 anni si è registrata una diminuzione complessiva della mortalità per questa neoplasia del 16,2%, nonostante questo rimane la prima causa di morte per tumore nelle donne (il 31%).

1.2.2 Fattori di rischio

I principali fattori di rischio associati all'insorgenza della malattia sono in primo luogo l'**età** dove il rischio aumenta con l'invecchiamento: l'incidenza è più elevata nelle donne di età compresa tra 65 e 74 anni. L'età mediana alla diagnosi è di 63 anni. [2].

I **fattori riproduttivi** inoltre possono leggermente aumentare il rischio, fra questi ricordiamo: una maggiore durata del periodo fertile dovuta a un primo ciclo mestruale precoce (prima dei 12 anni) o a una menopausa tardiva (dopo i 55 anni), una maggiore esposizione dell'epitelio ghiandolare agli estrogeni, l'assenza di gravidanze o una prima gravidanza portata a termine dopo i 30 anni ed, infine, non aver allattato al seno.

Le **terapie ormonali**, come l'uso di alcuni tipi di contraccettivi ormonali orali e di alcune terapie ormonali sostitutive in menopausa per contrastarne i sintomi, possono essere considerate un ulteriore fattore di rischio: nello studio randomizzato Women's Health Initiative, la terapia ormonale menopausale (estrogeni più un progestinico) ha aumentato moderatamente il rischio dopo solo 3 anni di utilizzo [3]

La presenza di una **malattia benigna della mammella**, l'anamnesi e il riscontro di una lesione che ha richiesto una biopsia per confermarne la natura nella storia clinica della paziente è associata a un lieve aumento del rischio.
Ulteriore fattore di rischio non trascurabile è lo **stile di vita**, fra questi il sovrappeso e l'obesità, spesso legati a un'alimentazione ricca di grassi e zuccheri raffinati e povera di frutta e verdura, oltre al consumo di alcol e al fumo possono contribuire allo sviluppo della neoplasia con modalità dose-dipendente nel caso di alcol e fumo.

Ad ultimo la **familiarità ed ereditarietà**, si stima che il 5-10% circa dei tumori mammari sia ereditario, ovvero sia legato alla presenza di una mutazione trasmessa dai genitori in specifici geni. Tra i geni di questo tipo più noti e studiati vi sono BRCA1 e BRCA2: mutazioni in questi geni sono responsabili del 50% circa delle forme ereditarie di tumore della mammella. (AIRC)

1.2.3 Classificazione

1.2.3.1 Classificazione istologica WHO

La maggior parte dei carcinomi della mammella è costituita da tumori epiteliali (carcinomi) che si sviluppano dalle cellule che rivestono dotti o lobuli; meno comuni sono i tumori non epiteliali dello stroma di sostegno

La classificazione istologica del carcinoma mammario si basa sulla classificazione WHO (*World Health Organization*), attualmente in uso è la V edizione pubblicata nel 2019 che prevede la suddivisione delle neoplasie in base al tipo istologico. [4]

TUMORI EPITELIALI

Carcinoma lobulare
Carcinoma Tubulare
Carcinoma cribriforme
Carcinoma mucinoso
Cistoadenocarcinoma mucinoso
Carcinoma infiltrante micropapillare
Adenocarcinoma apocrino
Carcinoma metaplastico

Tumori rari del tipo ghiandole salivari
Carcinoma a cellule aciniche
Carcinoma adenoideo cistico
Carcinoma secretorio
Carcinoma mucoepidermoide
Adenocarcinoma polimorfo
Carcinoma a cellule alte con polarità invertita

Neoplasie neuroendocrine
Tumore neuroendocrino
Lesione a cellule colonnari
Iperplasia duttale atipica

Proliferazioni epiteliali benigne e precursori

Iperplasia duttale

Lesioni a cellule colonnari

Iperplasia duttale atipica

Adenosi e lesioni sclerosanti benigne

Adenosi sclerosante

Adenoma apocrino

Adenosi microghiandolare

Cicatrice radiale

Adenomi

Adenoma tubulare

Adenoma duttale

Tumori mioepiteliali

Adenoma pleomorfo

Adenomioepithelioma

Carcinoma epiteliale-mioepiteliale

Neoplasie papillari

Papilloma intraduttale

Carcinoma duttale in situ

Carcinoma papillare incapsulato e/o con invasione

Carcinoma solido-papillare in situ o con invasione

Adenocarcinoma intraduttale papillare con invasione

Neoplasia lobulare non invasiva

Iperplasia lobulare atipica

Carcinoma lobulare in situ classico, florido o pleomorfo

Carcinoma duttale in situ

Carcinoma intraduttale non infiltrante

Carcinoma intraduttale di grado intermedio

Carcinoma intraduttale di alto grado

TUMORI FIBROEPITELIALI

Fibroadenoma

Tumore filloide

TUMORI DEL CAPEZZOLO

Adenoma del capezzolo

Malattia di Paget del capezzolo

TUMORI MESENCHIMALI

Tumori vascolari

Tumori fibroblastici e miofibroblastici

Tumori dei nervi periferici

Tumori del muscolo liscio

Tumori del tessuto adiposo

TUMORI DELLA MAMMELLA MASCHILE

Carcinoma invasivo

Carcinoma in situ

TUMORI METASTATICI

Tabella 1-Classificazione WHO

1.2.3.2 Stadiazione TNM

Il sistema di stadiazione nazionalmente riconosciuto ed utilizzato è il sistema TNM, entrato in uso definitivamente con l'ultima ed ottava edizione del 2017 dell'Unione Internazionale Contro il Cancro. Tale sistema è fondamentale per definire la prognosi sulla base di tre parametri principali: T dimensione, N interessamento linfonodale, M presenza di metastasi.

La classificazione è applicabile soltanto ai carcinomi e, nel caso di tumori multipli della stessa mammella si fa riferimento a quello con parametri prognostici peggiori. In caso di carcinomi bilaterali vanno invece classificati indipendentemente. [5]

- T, il parametro T prevede la valutazione delle dimensioni della neoplasia

Tx	Tumore primitivo non definibile
T0	Non c'è evidenza di tumore primitivo
Tis	Carcinoma in situ, comprende sia carcinoma duttale in situ che malattia di Paget
T1	Tumore dalla dimensione massima di 2cm T1mi 0,1 cm T1a 0,1 cm< d <0,5 cm T1b 0,6 cm< d <1 cm T1c 1,1 cm< d < 2 cm
T2	Tumore con dimensione compresa fra i 2cm e i 5 cm
T3	Tumore con dimensione superiore a 5cmm nella sua dimensione massima

T4	Qualsiasi tumore con estensione diretta alla parete toracica e/o alla cute con ulcerazioni o noduli cutanei T4a estensione alla parete toracica T4b Ulcerazione, noduli o edema della cute T4c presenza contemporanea delle caratteristiche T4a e T4b

Tabella 2-Stadiazione TNM, parametro T

- N, riguarda la presenza o l'assenza di coinvolgimento linfonodale che, nel carcinoma mammario, risulta essere uno dei parametri prognostici principali

Nx	Linfonodi regionali non valutabili
N0	Linfonodi regionali liberi da metastasi
N1	Linfonodi ascellari omolaterali metastatici e mobili
N2	Linfonodi ascellari omolaterali metastatici e clinicamente fissi N2a fissi tra di loro o ad altre strutture N2b clinicamente rilevabili con assenza di metastasi clinicamente evidenti
N3	Metastasi linfonodale clinicamente rilevabili ed evidenti N3a metastasi nei linfonodi sottoclaveari omolaterali N3b metastasi nei linfonodi mammari interni e ascellari

	N3c metastasi nei linfonodi sovraclaveari

Tabella 3-Stadiazione TNM, parametro N

- M, riferito alla presenza o assenza di metastasi

Mx	Metastasi a distanza non accertabili
M0	Non sussiste evidenza clinica o radiologica di metastasi a distanza cM0(i+) non evidenza clinica o radiologica di metastasi a distanza, ma depositi di cellule tumorali evidenziati mediante biologia molecolare o microscopicamente nel sangue, midollo osseo o in altri tessuti diversi dai linfonodi regionali, di dimensioni non superiori a 0,2 mm in una paziente senza segni o sintomi di metastasi
M1	Metastasi a distanza evidenziate mediante esami clinici, radiologici o istologicamente dimostrati di dimensioni superiori a 0,2mm

Tabella 4-Stadiazione TNM, parametro M

1.2.3.3 Classificazione molecolare

I tumori epiteliali possono esprimere recettori ormonali; mediante questi biomarcatori è possibile distinguere sottotipi biologici associati a prognosi variabile e differenti approcci farmacologici, quali:

-**Luminal A**, espressione recettoriale di ER e PR positivi ed HER2 negativo, solitamente presentano basso indice proliferativo e prognosi migliore per la risposta favorevole a terapia endocrina

-**Luminal B**, ER positivo PR debolmente positivo ed espressione di HER2 variabile, presenta maggiore indice proliferativo rispetto il sottotipo A e prognosi buona anche se generalmente peggiore rispetto il Luminal A.

-**HER2 positivo**, solitamente associato ad ER e PR negativi, scarsamente differenziati ed indice proliferativo alto, prognosi abbastanza favorevole per la presenza di terapie biologiche mirate

-**Triplo negativo**, nessuno dei recettori sopra citati risulta essere espresso nel tessuto tumorale, associato ad elevato indice proliferativo e prognosi peggiore per assenza di target biologici attaccabili.

Secondo studi statistici circa l'80% delle pazienti in postmenopausa e il 20% delle pazienti in premenopausa con carcinoma mammario hanno un tumore positivo per i recettori degli estrogeni (ER+); inoltre circa il 70% circa di tutti i tumori al seno è positivo per i recettori del progesterone. In circa il 15% delle pazienti con carcinoma mammario, i recettori HER2 sono sovraespressi. La maggior parte dei tumori al seno è positiva per i recettori ormonali e negativa per HER2 (circa il 70%); il 12% è triplo negativo (recettori ormonali negativi e HER2 negativo). [6]

1.3 METASTASI NEL CARCINOMA DELLA MAMMELLA

Per metastasi si intende quel processo per il quale le cellule tumorali della neoplasia primitiva si diffondono dal sito di origine in altri tessuti mediante vie e modalità diverse quali il circolo sanguigno, linfatico o per adiacenza dei distretti. Nel distretto dove andranno a localizzarsi potranno dare origine ad una nuova massa tumorale moltiplicandosi. La metastasi mantiene generalmente le caratteristiche del tumore primitivo con la possibilità quindi di poterne riconoscere l'origine tissutale.

Il processo di formazione di metastasi prevede più fasi: [7]

1. **Distacco**: alcune cellule tumorali acquisiscono la capacità di muoversi e si separano dal tumore primario.
2. **Invasione**: le cellule attraversano i tessuti circostanti e penetrano nei vasi sanguigni o linfatici.
3. **Circolazione**: le cellule viaggiano nel sangue o nella linfa, resistendo agli attacchi del sistema immunitario.
4. **Arresto e colonizzazione**: raggiungono un nuovo sito, si fermano e penetrano nei tessuti. Possono restare "dormienti" anche per lungo tempo, per poi riattivarsi e iniziare la fase di crescita metastatica.
5. **Crescita**: le cellule si moltiplicano formando una nuova massa tumorale.

Ogni neoplasia avrà poi delle caratteristiche intrinseche riguardo i siti preferenziali di metastasi e modalità.

Per quanto riguarda le metastasi di carcinoma mammario, queste tendono a diffondersi principalmente verso ossa, polmoni, fegato e cervello. Tale processo avviene in quanto le cellule tumorali che si staccano dal tumore primario possono entrare facilmente nei vasi linfatici presenti nella mammella e raggiungere i linfonodi ascellari, da cui possono poi immettersi nella circolazione sanguigna.

Una volta nel sangue, queste cellule hanno maggiori probabilità di insediarsi in organi riccamente vascolarizzati, come le ossa o il fegato, dove trovano un ambiente favorevole alla crescita.

La maggior parte dei pazienti oggi vivi in Italia con carcinoma mammario metastatico (circa 55.000) ha presentato una ripresa di malattia dopo un trattamento per una forma iniziale di neoplasia mammaria (solo il 6-7% delle neoplasie mammarie esordisce in stadio IV de-novo). [8]

1.4 ESTROGENI ED INTERAZIONE CON IL TESSUTO MAMMARIO

1.4.1 Estrogeni

Gli estrogeni sono ormoni che svolgono un ruolo cruciale a livello organico in quanto esercitano il controllo di moltissimi processi fisiologici sia nelle donne che negli uomini. [9]

Fanno parte della categoria di ormoni steroidei, ovvero biomolecole derivanti dal colesterolo con struttura base ciclopentanoperidofenantrenica.
La sintesi su richiesta di questi ormoni avviene principalmente a livello della corticale del surrene, testicoli ed ovaie e possiamo distinguere due grandi macrocategorie:

- **Corticosteroidi**, di cui fanno parte i Glucocorticoidi e Mineralcorticoidi, coinvolti nella risposta allo stress, metabolismo, regolazione immunitaria ed equilibrio idrico-salino

- **Ormoni sessuali** di cui fanno parte Androgeni, Estrogeni e Progestinici fondamentali per lo sviluppo di caratteri maschili e femminili oltre che per la regolazione del ciclo mestruale e le funzioni riproduttive

Per quanto riguarda gli estrogeni, la biosintesi di questi nelle donne in età pre-menopausale avviene principalmente a livello ovarico, del tessuto adiposo, fegato e ghiandole surrenali, ovvero in tutti quegli tessuti che presentano la possibilità di codifica ed espressione dell'enzima base per la produzione di questi mediante aromatizzazione.

Esistono quattro tipi principali di estrogeni fisiologici nelle donne, che si differiscono per potenza ed effetti fisiologici, ricordiamo:

- **Estradiolo** (E2 o 17β-estradiolo), causa induzione dell'attività proliferativa promuovendo crescita delle cellule di granulosa dei follicoli ovarici,

determinando le caratteristiche sessuali femminili e controllando il ciclo riproduttivo mestruale oltre alla regolazione del metabolismo epatico ed osseo. È proprio la perturbazione dell'omeostasi di E2 che contribuisce allo sviluppo di tumori al seno, endometrio e ovaio.

- **Estrone** (E1), con funzione simile all'E2 ma meno potente
- **Estidiolo** (E3), questo tipo contribuisce nel controllo dei sintomi della menopausa precoce mancando però degli effetti proliferativi tipici dell'E2

Lo svolgimento di queste specifiche funzioni è mediato dall'interazione con rispettivi recettori: recettori nucleari come ER-α e ER-β e recettori di superficie (GPR30 ed ER-X).

- ER, appartengono alla superfamiglia dei recettori nucleari indotti da ligandi che regolano l'espressione genica della cellula mediante attivazione di fattori di trascrizione e interazioni con il DNA cellulare. L'attivazione di questi recettori avviene mediante il legame con l'ormone che permette il distacco dal complesso proteico che ne inibisce l'attività. A questo punto è possibile l'interazione del recettore con specifiche regioni del DNA regolatorie dei geni target. La regolazione trascrizionale da parte di questo può avvenire seguendo due vie di segnalazione diversa: la via classica che prevede il legame diretto del recettore a degli elementi specifici di risposta agli estrogeni nei promotori genici (ERE), nella via non classica il recettore agisce come coattivante con conseguente attivazione a cascata delle chinasi citoplasmatiche.

  L'esistenza della via non classica è stata sceintificamente confermata mediante uno studio del 2005 dell'accademia di Oxford all'interno del quale è stata effettuata un'analisi globale dell'espressione genica del fattore di trascrizione dei recettori estrogenici nel cancro al seno.[10]

- Recettori di superficie come GPR30 ed ER-X , coinvolti in risposte cellulari rapide in quanto non utilizzano vie di segnalazione genomiche e

trascrizionali come l'ER. Tali vie di segnalazione includono l'attivazione di proteine chinasi quali MAPK e PI3K portando, infine, l'attivazione di fattori trascrizionali e cambiamenti di espressione genica.

1.4.2 Aromatasi

L'aromatasi, nota anche come citocromo P450 19A1 (*CYP19A1*) è l'enzima chiave che permette, mediante attività catalitica, la regolazione della sintesi degli estrogeni a partire dall'Androstenedione, precursore comune degli ormoni sessuali maschili e femminili. [11]

L'aromatasi catalizza la conversione degli androgeni in estrogeni ed è ampiamente espressa nelle gonadi di entrambi i sessi. Nello specifico, nelle ovaie femminili l'aromatasi è espressa principalmente nelle cellule granulosa e luteali, mentre nelle gonadi maschili si manifesta nei testicoli e nelle ghiandole accessorie. Questa distribuzione garantisce livelli adeguati di estradiolo per lo svolgimento fisiologico delle sue funzioni. [12]

La sua espressione è strettamente regolata da fattori che permettono la regolazione specifica di questo nei tessuti come ormoni, citochine, fattori di crescita e segnali locali.
La sua attività inoltre può essere regolata a livello cellulare mediante mediatori chimici: l'aumento di ATP. Mg2+ o CA2+ causano un'inibizione indotta dell'enzima.

L'aromatizzazione è il processo biochimico che sta alla base della sintesi degli ormoni estrogenici. La sua attività si esplica negli ultimi passaggi della biosintesi degli estrogeni agli androgeni trasformando l'androstenedione in estrone e testosterone in estradiolo.

Il processo di biosintesi catalizzato dall'aromatasi prevede l'idrossilazione dei precursori androgenici mediante una reazione ossigeno-dipendente e con l'utilizzo di tre molecole di NADPH per produrre la nuova molecola di estrogeno. [11]

1.4.3 Estrogeni e tessuto mammario

Lo sviluppo post-puberale della ghiandola mammaria è estremamente controllato dal 17β-estradiolo mediante l'interazione con il recettore estrogenico ERα.
Lo studio dell'interazione degli ormoni estrogenici con il tessuto mammario è stato profondamente valutato mediante l'utilizzo del tessuto mammario di topo, che trova con quello umano delle somiglianze nei processi di sviluppo, nell'organizzazione cellulare e nelle molecole di segnalazione.
Infatti, è stato dimostrato come modelli murini carenti del recettore ERα presentavano uno sviluppo non ottimale della ghiandola mammaria, dimostrando il ruolo cruciale degli estrogeni per lo sviluppo di questo.
Il recettore estrogenico è espresso in una sottopopolazione caratteristica delle cellule mammarie ovvero la linea cellulare luminale ERα-positiva

Quindi, gli estrogeni, assieme al progesterone, hanno un ruolo fondamentale nello sviluppo post-puberale della ghiandola mammaria promuovendo la crescita e l'allungamento dei dotti mammari, proliferazione delle cellule epiteliali mammarie e lo sviluppo e il mantenimento della ghiandola mammaria.

Storicamente, gli estrogeni sono stati associati inoltre ad un aumento del rischio del cancro al seno.
La correlazione è definita anche dall'utilizzo del termine tumore "ormone-dipendente" che allude alla possibilità che la presenza di ormoni estrogenici o progestinici stimolino la crescita della neoplasia; infatti, la maggior parte dei carcinomi mammari, di cui si stima il 70%, mantengono l'espressione di ER e

quindi la capacità di utilizzare la segnalazione estrogenica a proprio vantaggio proliferativo.

Infatti, secondo degli studi, l'esposizione a lungo termine di agenti estrogenici endogeni o esogeni aumenta il rischio del cancro al seno andando a correlare questo fra i principali fattori di rischio allo sviluppo della neoplasia. [13]

Uno studio del 2012 ha approfonditamente valutato, esaminando i dati derivanti da 117 studi epidemiologici, la correlazione fra l'esposizione estrogenica fisiologica, escludendo quindi le pazienti che hanno fatto uso di terapia ormonale sostitutiva, e l'insorgenza del cancro al seno calcolando quindi il rischio relativo. I risultati hanno confermato come il rischio di cancro al seno è aumentato di un fattore significativamente maggiore per ogni anno più giovane alla menarchia rispetto a ogni anno più anziano in menopausa, indicando che menarchia e menopausa potrebbero non influenzare il rischio di cancro al seno semplicemente estendendo gli anni riproduttivi totali delle donne. Gli ormoni ovarici endogeni sono più rilevanti per la malattia positiva per i recettori degli estrogeni che per quella negativa e per i tumori lubulari rispetto ai tumori duttali. [14]

1.5 TERAPIE ENDOCRINE

1.5.1 Storia

In quanto il tumore al seno è una delle più frequenti neoplasie riscontrate nella popolazione femminile, gli approcci terapeutici che sono stati elaborati nel tempo sono innumerevoli e sempre più specifici; infatti, i progressi della medicina volta al contrasto della malattia hanno portato ad un importante aumento della sopravvivenza.

Alla fine dell'Ottocento, l'unica cura per il cancro al seno era la mastectomia, pratica chirurgica introdotta nel 1894 associata solitamente a primi esperimenti di radioterapia.

Durante tutti gli anni '70 il trattamento del tumore al seno viene rivoluzionato: nel 1971 viene dimostrato che nei casi di malattia ai primi stadi si può evitare la mastectomia radicale in favore di un approccio conservativo capace di ridurre il dolore, migliorare il recupero post-operatorio e cambiare radicalmente l'impatto psicologico della mastectomia; tale rivoluzione porta soprattutto il nome del professor Umberto Veronesi.

Nel 1975, grazie al contributo italiano del professor Gianni Bonadonna, viene sdoganato il concetto di terapia adiuvante nel tumore del seno. Dagli studi condotti è stato dimostrato che le donne con tumore al seno, se trattate con chemioterapia dopo l'operazione, hanno minori possibilità di andare incontro a recidiva.

Sul finire degli anni '70 il concetto di quadrantectomia, ovvero l'utilizzo di una chirurgia conservativa per alcune forme di tumore al seno, viene definitivamente sdoganata grazie ad uno storico lavoro di Umberto Veronesi pubblicato dal New England Journal of Medicine. [15]

Sempre alla fine degli anni Settanta arrivò la prima terapia anti-ormonale, il tamoxifene, usato inizialmente nei tumori metastatici e solo in seguito come terapia adiuvante, nel 1986 viene approvato l'utilizzo di tale farmaco come molecola utile nella prevenzione delle recidive per il cancro al seno. Infatti, grazie agli importanti studi nel campo è stato possibile definire in questi anni due categorie tumorali: ormonosensibili e non. Il Tamoxifene ha azione selettiva rispetto alla prima categoria permettendo di registrare, all'inizio degli anni '90, il calo della mortalità relativa alla patologia grazie alla funzionalità delle terapie stesse.

Alla fine degli anni '90 la lotta al cancro prevede un ulteriore passo avanti: i primi farmaci a bersaglio molecolare. Solo successivamente, mediante la messa a punto del primo anticorpo monoclonale Trastuzumab contro i tumori HER2, si registrerà un ulteriore miglioramento degli approcci terapeutici.

Le ultime conquiste in ordine di tempo sono state l'approvazione di una nuova classe di farmaci per il tumore metastatico ormonosensibile come gli inibitori delle chinasi ciclina dipendenti CDK 4/6 o con mutazione BRCA. Sono inoltre stati presentati ad Esmo 2018 i primi dati positivo per una immunoterapia (anti PD-1) per il cancro triplo negativo.

1.5.2 Terapia ormonale e classificazione dei farmaci

La terapia ormonale, o terapia endocrina, è un approccio farmacologico e la prima terapia biologica a bersaglio molecolare messa a punto con obbiettivo l'impedimento degli ormoni, quali estrogeni o progesterone, di avere la loro azione proliferativa a livello neoplastico. Tale terapia è ovviamente applicabile soltanto per quelle neoplasie mammarie sensibili all'azione degli ormoni, ovvero ER+ e PR+ anche definite forme Luminal A e B.

Le modalità terapeutiche sono molte e la scelta del trattamento da adottare dipende da tre fattori principali [16]: il grado di avanzamento della malattia, lo stato fertile della donna, soprattutto la presenza o meno di menopausa e l'età della paziente.

Nello specifico, gli approcci al trattamento del tumore della mammella sensibile alla terapia ormonale sono diversi e possono essere classificati in:

- Modulatori selettivi dei RE (**SERM**)

Di questa categoria il farmaco più rilevante è il Tamoxifene, questa molecola funge come antagonista competitore del recettore occupando il sito di legame per gli ormoni bloccandone quindi l'azione senza però attivarlo.

In tal senso il Tamoxifene impedisce la cascata proliferativa stimolata dagli estrogeni contrastando la crescita delle cellule neoplastiche.

Moltissime sono state le evidenze scientifiche sui benefici legati all'assunzione del Tamoxifene; Infatti, in uno studio controllato randomizzato del National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Breast Cancer Prevention Trial (P-1) ha dimostrato come, dopo 5 anni di assunzione del farmaco e 7 anni di follow-up, l'assunzione del farmaco ha portato riduzioni significative del cancro al seno (il tasso cumulativo di cancro invasivo al seno è stato ridotto da 42,5 ogni 1000 donne nel gruppo placebo a 24,8 ogni 1000 donne nel gruppo tamoxifene) con corrispondente però aumento del rischio di eventi tromboembolitici e tumori dell'endometrio. [17]

Questi risultati, con altri, hanno permesso quindi l'applicazione della terapia con Tamoxifene e altri modulatori selettivi del RE come terapia di elezione da più di 30 anni.

- Inibitori dell'aromatasi (**IA**)

La modalità d'azione degli IA si discosta da quella dei SERM, in questo caso infatti tali molecole impediscono la produzione degli estrogeni a valle bloccando l'azione dell'aromatasi non andando ad influire quindi sulla funzionalità recettoriale.

Questi farmaci vengono prettamente indicati nel caso di donne in menopausa che fisiologicamente presentano un blocco della produzione estrogenica da parte delle ovaie: infatti, nelle donne in postmenopausa, l'aromatizzazione degli androgeni da parte delle gonadi costituisce la principale fonte di produzione di estrogeni dopo la cessazione della funzione ovarica. Dal momento che la maggior parte delle neoplasie mammarie sono ormono-dipendenti, sono stati ampiamente studiati composti in grado di interagire con il pathway di segnale estrogenico. Il tamoxifene è stato il primo farmaco utilizzato nel trattamento del carcinoma mammario in grado di bloccare il segnale estrogenico; tuttavia il suo utilizzo è associato a numerosi effetti collaterali, quali l'aumentato rischio di neoplasia endometriale ed il tromboembolismo venoso. Ciò è legato al suo effetto estrogenico parziale a livello di utero e sistema vascolare. Alla luce di tutto ciò è stato studiato un approccio alternativo di blocco estrogenico tramite l'inibizione dell'azione dell'aromatasi già nei primi anni '70 da Schwarzel.
Attualmente tre inibitori dell'aromatasi (AI) sono disponibili per l'utilizzo clinico: anastrozolo, letrozolo ed exemestane. [18]
Per quanto riguarda l'**Anastrozolo** viene utilizzato principalmente per il trattamento del carcinoma mammario nelle donne che hanno superato la menopausa. Si usa per il trattamento del carcinoma della mammella, in particolare nei casi in stadio avanzato o recidivante, ma anche in quelli in stadio iniziale [19] a differenza dell'**Examesane** utilizzato principalmente per il trattamento del carcinoma mammario avanzato nelle donne in stato di post-menopausa (naturale o indotta), ma anche del carcinoma mammario maschile. [20]

Tali molecole condividono la modalità di azione, ovvero il blocco del processo di aromatizzazione diminuendo la quantità di estrogeno in circolo.

Recentemente l'associazione di inibitori di aromatasi con alcuni Inibitori di CDK4/6 è suggerita anche per il trattamento delle donne con tumore della mammella con recettori ormonali positivi in fase precoce. Studi recenti hanno infatti mostrato come il trattamento di combinazione di inibitore dell'aromatasi e

inibitore di CDK4/6 rispetto al solo inibitore dell'aromatasi porti a una maggiore riduzione del rischio di recidiva in persone con rischio elevato. Nei casi in cui venga scelta questa combinazione, la durata complessiva della terapia con inibitore dell'aromatasi resta di 5 anni o più a seconda del caso specifico.

- **Antagonisti dell'LHRH**

Questi farmaci agiscono a monte rispetto agli altri farmaci ormonali bloccando la produzione dell'ormone luteinizzante LH con cui l'ipofisi stimola l'attività delle ovaie e dei testicoli. In questo modo le ovaie interrompono la produzione estrogenica con conseguente diminuzione dell'ormone in circolo.

Talii molecole sono indicate nelle donne in pre-menopausa con lo scopo di indurre una menopausa temporanea associandolo, a volte, ad un IA o Tamoxifene.

- **SERD**

I SERD, ovvero Degradatori Selettivi dei Recettori Estrogenici sono farmaci fondamentali in quanto offrono un'opzione di trattamento più efficacie e meno invasiva per le pazienti con cancro al seno Er+ soprattutto nel momento in cui sviluppano resistenza a terapia endocrina.

Il meccanismo più comune di resistenza è la mutazione del gene ESR1 ed è stata per lungo tempo una sfida per la gestione della malattia recidivante. I SERD sono stati sviluppati proprio in questo contesto, farmaci di prima generazione come il Fluvestrant hanno mostrato una certa attività soprattutto in neoplasie mutanti ESR1.

Inizialmente questi farmaci sono stati sviluppati mediante via di somministrazione intramuscolare che ne determinava però bassa biodisponibilità e di conseguenza necessità di iniezioni multiple. Nell'ultimo periodo, quindi, sono stati formulati e sono in fase di sperimentazione SERD orali di cui è fortemente discussa l'efficacia e la sicurezza clinica. Secondo articoli di letteratura da maggio 2023, l'elacestrant

rimane l'unico SERD orale ad aver ricevuto l'approvazione FDA per il trattamento del carcinoma al seno metastatico. [21]

Il meccanismo di azione dei SERD prevede il legame con il RE inducendone la degradazione, riducendo così l'attività complessiva del recettore. In questo caso, a differenza dei SERM, questi agiscono esclusivamente come agonisti del recettore legando questo e promuovendo a valle la diminuzione dell'espressione e dell'attività dei geni target del RE.

1.6 ESR1

1.6.1 Generale

L'ESR1 è un gene che fa parte della superfamiglia di geni codificanti per i recettori ormonali nucleari; questi, in generale, sono coinvolti nella regolazione dell'espressione genica eucariota influenzando la proliferazione e la differenziazione cellulare nei tessuti bersaglio. [22]

Nella specie umana, i recettori estrogenici sono codificati da due geni differenti che permettono l'esistenza di due isoforme distinte del recettore stesso: ESR1 per ERα e ESR2 per ERβ, questi si trovano su cromosomi diversi, il 6 per ESR1 e il 14 per ESR2.

Questi sono responsabili della regolazione dello sviluppo del sistema riproduttivo femminile, della conservazione della massa ossea e della protezione del sistema nervoso centrale, in tal senso, l'espressione genica di questi predomina nelle cellule endometriali, ipotalamo, ovaio e testicoli.

Nello specifico, ESR1 codifica per il recettore estrogenico nucleare ERα che funge da fattore trascrizionale attivato da ligando causando, a valle, tutte le sue funzioni caratteristiche. Questo recettore presenta una stretta omologia amminoacidica con l'isoforma β (ERβ) ma attualmente il ruolo di questo sottotipo recettoriale nella carcinogenesi non è stato ancora ben chiarito.

1.6.2 Struttura

Questo gene si ritrova dalla posizione ventiquattro alla ventisette del braccio lungo del cromosoma sei (6q24–q27), sono otto gli esoni che codificano per la proteina

nucleare in questione per una struttura finale di 595 aa divisi in sei domini, distinti dalla A alla F. [23]

- **I domini A e B**, si posizionano all'estremità ammino-terminale e contengono il dominio AF-1, la cui funzione è l'attivazione della trascrizione di geni target indipendente dal ligando.
- **Il dominio C** comprende il dominio di legame al DNA (DBD), tale dominio è responsabile della dimerizzazione della struttura recettoriale e del legame con l'elemento di risposta all'estrogeno, ovvero sequenze di promotori genici dipendenti dall'ormone stesso.
- **Il dominio D,** definito "cerniera" in quanto responsabile della sinergia fra il dominio AF-1 e AF-2, questo contiene un segnale di localizzazione nucleare NSL che, in seguito al legame con il ligando, viene esposto mediando la traslocazione nucleare.
- **Il dominio E**, questo contiene la zona LBD, ovvero il dominio di legame del ligando, e l'AF2 che si presenta come co-regolatore dipendente dal ligando. All'estremità C-terminale si trova l'elica H12 che funge da struttura cruciale per determinare lo stato agonista o antagonista del recettore.
- **Il dominio F** costruisce la parte finale della proteina, questo modula l'attività trascrizionale specifica del recettore ed è coinvolto nell'interazione con i coattivatori.

La maggior parte delle mutazioni che andremo a prendere in considerazione ricadono nella zona AF2/LBD, infatti, secondo dei dati statistici condotti da COSMIC e cBioPortal del 2019 delle 62 mutazioni identificate, 47 sono state riscontrate nel dominio di legame al ligando, e diverse sono state associate all'attivazione indipendente dal ligando del recettore degli estrogeni. [24]

1.6.3 Meccanismo di attivazione recettoriale

L'origine evolutiva del sistema di segnalazione degli estrogeni rimane poco chiara; tuttavia, la ricerca sugli invertebrati ha fornito spunti sul percorso dei vertebrati. La segnalazione dipendente dal RE può essere classificata come genomica e non genomica.

Nella segnalazione genomica che coinvolge il RE, il complesso estrogeno-recettore viene traslocato nel nucleo, qui legano direttamente fattori di trascrizione che interagiranno poi con il DNA.

Nello specifico, il recettore subisce una modifica conformazionale nel momento in cui si ha l'interazione del ligando (l'E2 è il ligando biologicamente più potente e il principale responsabile dell'attivazione del recettore estrogenico) a livello della LBD.

Questo permette la formazione del legame del recettore al complesso proteico dello shock termico (HSP90), questo fattore causa la stabilizzazione del recettore e lo protegge dalla degradazione. È stato dimostrato nel 1984 come ERα senza ligando è una proteina costantemente degradata e di breve durata (emivita di 4–5 ore). [25]

L'attivazione recettoriale determina quindi la formazione di grandi complessi trascrizionali che coinvolgono molteplici fattori di trascrizione come, ad esempio, FOXA1 e GATA3. Tali fattori trascrizionali permettono l'interazione di ER con il DNA e la modificazione dell'espressione genica.

Si è dimostrato come l'interazione ER-cromatina è un processo dinamico nei tessuti mammari normali, alterato nei tumori al seno resistenti alle terapie endocrine, e mostra una maggiore intensità nelle lesioni metastatiche. [26]

Successivamente intervengono ulteriori modifiche post-traduzionali del recettore, tra cui la fosforilazione di residui aminoacidici che avvengono, ad esempio, a livello del dominio AF-1 e del dominio di legame DBD. Rilevante, in questo

contesto, è che la serina in posizione 118 del dominio AF1 risulti essere costitutivamente fosforilata nelle forme mutate di ESR1.

Nella segnalazione non genomica del RE, l'estrogeno si lega al recettore GPER situato nella membrana plasmatica. Questo meccanismo ha inizio al di fuori del nucleo ed è mediato dall'attivazione della via delle MAPK e non è correlato alla modificazione del processo trascrizionale

1.6.4 Mutazioni

Le mutazioni che andremo a prendere in considerazione che ricadono a livello del gene ESR1 (ESR1mut) sono alterazioni geniche con guadagno di funzione che, in tal senso, portano l'attivazione costitutiva e indipendente dal ligando del recettore estrogenico codificato dal suddetto gene.
Tali mutazioni si presentano con uno schema ben preciso che ne permette la correlazione ad un meccanismo di resistenza endocrino piuttosto che come motori oncogenici primari.
La maggior parte delle mutazioni note, si stima all'incirca l'80% [27], ricade all'interno del dominio di legame del ligando LBD che si pone come hotspot mutazionale dl gene come è possibile vedere in figura.

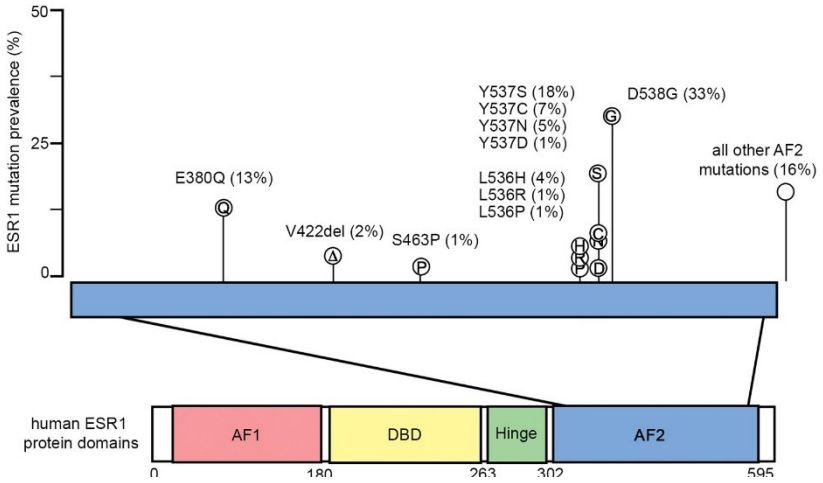


Figura 1-Prevalenza di mutazioni

La mutazione più comunemente riscontrata è la D538G, che prevede la sostituzione dell'aspartato in posizione 538 con la glicina. Si posiziona nel loop H11-H12 della LBD conferendo attività costitutiva indipendente dal ligando andando a modificare la conformazione del loop rendendola simile alla forma assunta nel momento del legame con l'ormone.

Il secondo sito per frequenza più mutato è Y537x, di questo moltissime sono le sostituzioni possibili della tirosina in posizione 537 tra cui la serina (Y537S 10-15%), asparagina Y537N (5-10%) e la Y537C con la sostituzione della tirosina con la cisteina (5-10%). Queste presentano una forte attività costitutiva, meno marcata nei confronti di alcune forme mutanti, derivata da una maggiore stabilità nella conformazione agonista. [27]

La E380Q è la terza mutazione più diffusa in frequenza, comporta la sostituzione di un glutammato carico negativamente con una glutammina neutra, causando squilibri di carica: questo meccanismo determina la formazione di uno stato conformazionalmente attivo del recettore. Studi scientifici hanno dimostrato come, per ottenere la stessa attività, le forme mutate di ESR1 con mutazione E380Q necessitavano 3 volte in meno la quantità di estradiolo rispetto alla forma wild type.

Inoltre, è presente un'altra forma mutazionale del recettore: la S463P che prevede la sostituzione della serina in posizione 463 con la prolina. Tale mutazione sembra avere una prevalenza minore nelle pazienti con cancro al seno metastatico. La sostituzione causa a livello proteico la promozione della dimerizzazione del recettore: la zona sembra, conseguentemente alla mutazione, incapace di ripiegarsi correttamente lasciando la zona di dimerizzazione aperta all'interazione. Si è dimostrato come questa modifica promuove la crescita tumorale indipendentemente dagli estrogeni pur non causando attività costitutiva elevata.

Infine, riguardo le mutazioni puntiformi che cadono a livello dell'amminoacido leucina 536, quattro sono le possibili sostituzioni studiate: L536H, R, P e Q.
Tali mutazioni determinano la costituzione di un RE resistente agli antiestrogeni con bassa attività costitutiva: questo meccanismo è probabilmente dovuto alla natura idrofoba dell'amminoacido in questione che ha come funzione il mantenimento della LBD in stato inattivo quando non è legata al ligando. La sostituzione della leucina con un amminoacido meno idrofobo causa la compromissione dell'integrità strutturale del recettore e il passaggio a stato conformazionalmente attivo. [24]

Come si dimostrerà in seguito, in una piccola percentuale di casi è possibile riscontrare la comparsa di mutazioni multiple che cadono in zone diverse del recettore: questo meccanismo comporta un trattamento complesso della neoplasia soprattutto in funzione al tipo di mutazione riscontrata.

In tabella si riassumono le mutazioni prese in considerazione con le principali caratteristiche che le distinguono.

Mutazione	**Frequenza**	**Localizzazione**	**Conseguenza funzionale**	**Impatto clinico**
D538G	38-45%	LBD, loop 12	Attività costitutiva	Efficacia ridotta degli IA, sensibilità ai SERD mantenuta, associata a una sopravvivenza libera da progressione

				più breve con exemestane in monoterapia
Y537X	25-42%	LBD, loop 12	Forte attività costitutiva	Efficacia ridotta degli inibitori dell'aromatasi; sensibilità ai SERD mantenuta; associata a una sopravvivenza globale peggiore
E380Q	1.1-10%%	LBD, tra H5 e H12	Attività costitutiva	Carico mutazionale più elevato
S463P	<3%	Fra H9 e H10	Modesta attività costitutiva	-
L536X	<3%	Fra H11 e 12	Modesta attività costitutiva	-
Multiple				Trattamento complesso, prognosi variabile in base alle specifiche

				mutazioni presenti

Tabella 5-Mutazioni ESR1

Per le percentuali di frequenza si fa riferimento al campione tissutale, in biopsia liquida le percentuali potrebbero discostarsi da questi parametri. [28]

1.6.5 Sviluppo e implicazioni

Come è stato già esplicato, elevati sono in frequenza i tumori al seno positivi al recettore estrogenico che, conseguentemente, trovano come approccio clinico standard per il trattamento l'utilizzo di terapie endocrine mirate all'attività del RE stesso. Esistono moltissime evidenze cliniche che confermano come lo sviluppo delle mutazioni ESR1 nelle cellule tumorali metastatiche vengano acquisite più frequentemente sotto la pressione selettiva della terapia con inibitori delle aromatasi.

Il meccanismo che sta alla base della selezione delle forme mutanti della neoplasia e il conseguente sviluppo della resistenza si pensa sia dovuto, supportato da numerosi studi clinici, alla crescita e l'espansione di cloni rari e resistenti alla terapia preesistenti in risposta alla pressione selettiva delle terapie mirate. Data la proprietà di resistenza endocrina indipendente dal ligando dei mutanti LBD *ESR1* e il loro riscontro quasi esclusivo nel cancro al seno metastatico, suggeriscono una selezione clonale di forme rare resistenti solo sotto la pressione del trattamento endocrino.

È possibile che, per la caratteristica intrinseca tumorale di accumulo mutazionale, rari cloni mutanti ESR1 siano presenti e non rilevabili nel tumore primitivo o essersi sviluppati nel corso del trattamento. In quanto questi presentano un vantaggio selettivo rispetto ai cloni sensibili alla terapia endocrina è possibile che avvenga l'espansione di questi e che diventino predominanti causando recidive.

Uno dei primi studi scientifici nell'ambito pubblicati nella AACR nel 2018 ha confermato la correlazione fra lo sviluppo delle mutazioni sul RE nelle pazienti trattate con terapia ormonale in contesto metastatico. [29]

Si stima che circa il 20% dei pazienti che si presentano con malattia precoce svilupperà resistenza manifestata come recidiva durante o dopo trattamenti endocrini adiuvanti. Nel contesto metastatico, i trattamenti endocrini portano a una regressione tumorale iniziale solo in circa il 30% dei pazienti e, inevitabilmente, in quasi tutti i pazienti si sviluppa una malattia resistente che porta alla progressione della malattia e infine alla morte. [30]

Moltissime sono state le applicazioni della ricerca per capire e studiare le modalità di sviluppo della resistenza e la selezione delle forme mutanti delle cellule tumorali. Infatti, solo in una bassa percentuale dei casi (15-20%) lo sviluppo di resistenza è associato alla perdita di espressione del recettore mentre nella maggioranza dei casi di resistenza endocrina, il RE continua ad essere espresso e attivo. Tale processo è stato attribuito, in conclusione, ad aberrazioni genetiche acquisite che alterano la proteina bersaglio stessa, componenti aggiuntivi del suo percorso o altre vie compensative per resistere all'effetto inibitorio del farmaco.

Quello che è prettamente di nostro interesse è il meccanismo di sviluppo delle mutazioni attivanti della LBD nella malattia metastatica resistenze.

Diversi studi presentano come obbiettivo la valutazione del meccanismo che sta alla base dello sviluppo delle mutazioni puntiformi a carico della LBD di ESR1. Uno fra questi è lo studio BOLERO-2, gli studiosi si sono soffermati sullo studio di pazienti con malattia refrattaria ad Inibitori dell'Aromatasi recidivante o con progressione. Nelle coorti di studio prese in considerazione, nel 17,5% dei casi sono state riscontrate mutazioni a carico di ESR1.
Un ulteriore dato importante è come in bassissima frequenza tali mutazioni si riscontrano nella neoplasia primaria (3%). [31]

Questo dato è stato confermato successivamente in un altro studio nel quale è stata presa in considerazione la prevalenza delle alterazioni genetiche a livello della malattia metastatica al seno e non: è stato possibile riscontrare come ESR1 fosse uno degli unici geni che presentava una maggiore prevalenza in contesto metastatico. È quindi stato possibile dimostrare la correlazione fra lo sviluppo di malattie metastatiche e resistenza endocrina con le mutazioni a carico di questo gene. [32]

1.6.6 Rilevazione

Nel quadro attuale, quindi, risulta essere di estrema importanza lo studio e lo sviluppo di metodi di rilevazione sensibili e specifici.

È proprio in questo contesto che nasce l'idea dell'utilizzo della biopsia liquida come metodo di rilevazione. Infatti, in quanto le mutazioni di ESR1 sono fondamentalmente diverse dai biomarcatori genomici statici che possono essere testati una sola volta sul tessuto primario, risulta necessario in questo caso un metodo diverso di rilevazione. Inoltre, la malattia metastatica colpisce spesso le ossa che sono una zona anatomica difficile da campionare oltre che di difficile manipolazione per lo studio molecolare.

Lo studio plasmaMATCH ha dimostrato che l'analisi in biopsia liquida del ctDNA per ESR1 ha fornito risultati nel 99% dei pazienti, rispetto al 70–90% di successo del sequenziamento basato sul tessuto, con precisione comparabile e tempi di risposta più rapidi. [33]

Inoltre, a favore della tesi, in uno studio effettuato su 187 campioni attraverso il ctDNA è stato possibile rilevare mutazioni ESR1 in 18 pazienti in cui il tessuto era negativo, mentre il tessuto ha rilevato mutazioni in soli 3 pazienti in cui il ctDNA era negativo andando a confermare la possibilità dello studio in biopsia liquida, rispetto al tessuto, di rilevare l'eterogeneità tumorale e, nello specifico, mutazioni di ESR1. [34]

Nel nostro caso andremo a considerare la rilevazione delle mutazioni in Real-Time con la possibilità dello studio contemporaneo di 13 mutazioni somatiche del gene ESR1, anche se in notevole sviluppo e applicazione è la ricerca in NGS.

1.7 BIOPSIA LIQUIDA

1.7.1 Generale

La biopsia liquida è una modalità di raccolta di campioni mininvasiva estremamente attuale e di recente sviluppo volta alla rilevazione di biomarcatori tumorali circolanti nei fluidi corporei.

L'applicazione di maggiore interesse clinico è rappresentata dalla possibilità di valutare il profilo mutazionale del DNA tumorale circolante (circulating tumor DNA, ctDNA) che rappresenta un'esigua frazione del DNA libero circolante (circulating cell free DNA, cfDNA), isolato da sangue periferico.

La ricerca di alterazioni molecolari a carico dei biomarcatori predittivi di risposta al trattamento in biopsia liquida richiede piattaforme analitiche caratterizzate da elevata sensibilità e specificità per identificare alterazioni poco rappresentate nel torrente circolatorio. A causa della scarsa abbondanza del ctDNA nel torrente circolatorio, la presenza di DNA di origine tumorale è confermata solamente quando una mutazione driver e/o oncogenica viene rilevata. In questo contesto, il parametro per misurare l'abbondanza dell'allele mutato è la variant allele frequency (VAF), che indica il valore percentuale calcolato dividendo il numero di frammenti di DNA potatori dell'alterazione specifica per il numero totale di frammenti di DNA analizzati in quello specifico locus.

l fluidi corporei prevalentemente utilizzati per la biopsia liquida sono: il sangue venoso periferico, urina, liquido cerebrospinale, versamento pleurico o peritoneale, saliva, feci e sperma.

Tale approccio rappresenta un'alternativa diagnostica che si pone in opposizione nell'uso di campioni istologici per ottenere informazioni clinicamente rilevanti a fini diagnostici, prognostici e di monitoraggio.

Le principali aree di applicazione sono:

- valutazione della malattia minima residua (MRD): dopo intervento chirurgico o trattamento sistemico, la presenza di ctDNA può indicare persistenza di cellule tumorali residue non rilevabili con l'imaging convenzionale. La sua individuazione precoce può anticipare di mesi la recidiva clinica. [35]

- identificazione di mutazioni bersaglio: il sequenziamento del ctDNA consente di individuare mutazioni driver in geni caratteristici, utili per orientare l'impiego di farmaci a bersaglio molecolare. Questo approccio è ormai parte integrante del management di tumori come il carcinoma polmonare non a piccole cellule, il colon-retto metastatico e il carcinoma mammario.

- monitoraggio della risposta terapeutica: ripetendo il test nel tempo, è possibile valutare la comparsa di nuove mutazioni associate a resistenza acquisita o la riduzione del carico mutazionale in risposta al trattamento.

1.7.2 Biopsia liquida vs Tessuto

Sebbene le biopsie tissutali rimangano il gold standard della diagnostica oncologica queste presentano delle limitazioni che hanno segnato, nel tempo, la necessità di introdurre metodiche non invasive e dinamiche per un approccio clinico diagnostico più completo. [36]

È possibile sottolineare le differenze fra i due approcci metodologici

BIOPSIA TISSUTALE	BIOPSIA LIQUIDA
Invasiva	Non invasiva
Necessità di massa tumorale rilevabile	Possibile esecuzione con masse tumorali non rilevabili
Non adatta a riflettere omogeneità tumorale	Adatta per la valutazione di omogeneità tumorale
Influenzata dalla sede tumorale e localizzazione	Indipendente dalla sede tumorale
Non tollerata la ripetizione	Possibile ripetizione per follow-up
Permette diagnosi istologica e staging	Non permette staging e valutazione dell'istotipo tumorale

Tabella 6-Biopsia liquida vs Tessuto

1.7.3 Vantaggi

Le caratteristiche che rendono vantaggiosa nell'utilizzo la biopsia liquida rispetto alla biopsia tissutale sono

- Minima invasività e minimo costo, che la rendono utile per il follow-up e monitoraggio
- Dinamismo, offre una visione di insieme rispetto all'approccio classico che offre informazioni di un singolo punto nel tempo e nello spazio
- Ben supportata dai pazienti e senza la necessità di equipe medica complessa
- Possibilità di diagnosi precoce anche in assenza di massa tumorale visibile
- Risultati ottenuti come base la caratterizzazione biologica del cancro

Mediante la biopsia liquida è quindi possibile fornire informazioni preziose mediante analisi molecolare di biomarker tumorali rilasciati per esfoliazione delle stesse cellule neoplastiche in sviluppo come alterazioni genetiche e profili variazionali correlabili alla risposta terapeutica o progressione tumorale.

Inoltre, è grazie alla sua natura minimamente invasiva che è possibile eseguire il prelievo con frequenza permettendo il monitoraggio continuo della progressione della malattia.

1.7.4 Svantaggi

Sebbene mostri tutti questi vantaggi rispetto alla biopsia tissutale non è possibile ancora che possa sostituire il metodo tradizionale per la presenza di limiti chiari:

- Concentrazioni variabili dei biomarker all'interno del fluido biologico, in funzione del volume e della localizzazione della malattia causando falsi negativi. Le quantità di ctDNA sono variabili e dipendenti da: carico della malattia, indice di proliferazione delle cellule tumorali e localizzazione
- Impossible eseguire stadiazione e tipo istologico mediante biopsia liquida
- In presenza di eterogeneità tumorale, la biopsia liquida fornisce scarse informazioni sulla rappresentatività nel contesto del tumore del biomarcatore individuato.
- Problematiche pre e post-analitiche legate alla gestione e l'analisi del campione biologico oltre che all'interpretazione dei dati molecolari

1.7.5 Biomarker

Per biomarcatori in biopsia liquida si intendono quell'insieme di elementi riscontrabili e isolabili all'interno del fluido biologico fondamentali per fornire preziose informazioni sulla presenza e le caratteristiche biologiche della neoplasia.

Tali elementi vengono rilasciati dai tumori e riversati, in primo luogo, nel sangue per poi essere distribuiti negli altri fluidi corporei: in tal senso il sangue è considerato il materiale più comune da analizzare e quello che prenderemo in considerazione maggiormente.

I principali componenti riscontrabili nei biofluidi che possono essere la base per la ricerca molecolare sono:

- **CTC** (cellule tumorali circolanti)

Si intendono cellule tumorali che si distaccano dal loro sito di origine ed entrano nel sistema circolatorio causando metastasi a distanza.

Infatti, la diffusione delle cellule tumorali dal tumore primario nella circolazione può coinvolgere sia singole cellule sia gruppi cellulari contenenti più cellule tumorali circolanti (CTC), queste possono sopravvivere in circolazione, uscire dal flusso sanguigno ed essere causa di metastasi. [37]

- **cfDNA e ctDNA**

Il DNA tumorale circolante risulta come un sostanziale biomarcatore per la diagnosi precoce soprattutto di tumori che non dispongono di metodologie di screening adeguate e di complessa localizzazione.

Il primo rinvenimento di DNA cellulare libero (cfDNA) all'interno del sangue è avvenuto nel 1948 (Sorenson et al., 1994), ma la sua applicazione clinica diagnostica non è rilevabile fino alla metà degli anni '90 (Mandel & Metais, 1948) dove venne rintracciato nei sieri di pazienti oncologici.

La vera diffusione e l'impiego del ctDNA si può far corrispondere al campo della diagnostica prenatale con la rilevazione non invasiva delle malattie genetiche fetali (2011) con l'introduzione, in parallelo, delle metodiche di sequenziamento di massa NGS. [38]

Lo studio ha riportato un'elevata precisione della metodica, con riscontro della sindrome nel 98,6% dei casi con tasso di falsi positivi molto basso (0,20%). Tali evidenze su base clinica hanno permesso la conferma e l'applicabilità del metodo e quindi la possibilità di introduzione della metodica nella diagnostica.

Successivamente l'applicazione nel campo dell'oncologia è evoluta con il tempo: la valutazione e la ricerca del cfDNA offre la possibilità di diagnosi precoce, follow up e lo studio della firma molecolare della lesione, base per la ricerca e la rilevazione della resistenza ai farmaci.

Le pubblicazioni scientifiche riguardo lo studio del ctDNA presenta uno sviluppo esponenziale dal 2008 in poi, andando a sottolineare l'importanza della ricerca in questo campo. [39]

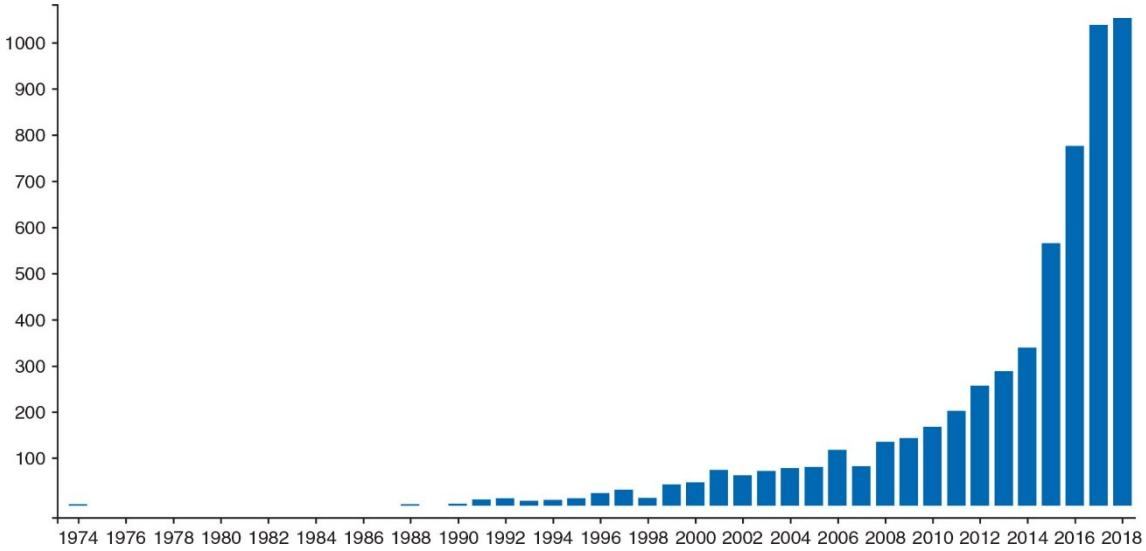


Figura 2- Pubblicazioni scientifiche riguardo lo studio del ctDNA

Il DNA cellulare libero (cfDNA) è costituito da frammenti di acido nucleico riscontrabile nei fluidi corporei sia in individui apparentemente sani o malati. Soltanto una piccola parte di questo può essere definito ctDNA, ovvero DNA tumorale libero, frammenti di acido nucleico rilasciati dal tumore nel flusso sanguigno; tale processo può essere legato a vari eventi scatenanti, tra cui necrosi, apoptosi e la capacità di esfoliazione della lesione stessa.

La differenza sostanziale fra i due, come riportato nella letteratura, prevede una maggiore frammentazione del cfDNA in pazienti con carcinoma colon rettale metastatico e NSCLC rispetto ai pazienti sani. [40]

È proprio grazie alla scoperta del nesso fra la presenza e la crescita di una lesione tumorale e la rilevazione di ctDNA che è stata possibile l'introduzione di questo come biomarcatore predittivo per l'adattamento e la risposta terapeutica in pazienti affetti da tumori.

Il primo approccio e la dimostrazione dell'utilità clinica dell'analisi del ctDNA sono stati mediante la ricerca mutazionale di geni RAS e BRAF nel carcinoma colon rettale metastatico, favorendo l'approccio in biopsia liquida rispetto all'analisi standard del tessuto tumorale in termini di velocità di esecuzione e sensibilità del test, grazie al riscontro di una maggiore presenza di mutazioni. [41]

In favore della tesi, è stato effettuato uno studio riguardante le variazioni del ctDNA per il monitoraggio della risposta tumorale alla terapia in pazienti con melanoma trattati con immunoterapia. È stata evidenziata l'associazione fra i livelli di ctDNA mutato aumentati e l'inferiore sopravvivenza libera da progressione e quindi la conferma dell'utilizzo del ctDNA come strumento per il monitoraggio terapeutico. [42]

L'analisi del ctDNA offre inoltre la possibilità di rilevare la malattia minima residua e monitorare la recidiva per poter permettere il miglioramento della gestione dei pazienti oncologici.

Per malattia minima residua si intende la quota di malattia residua ancora presente nell'organismo dopo trattamento chemioterapico, chirurgico o radioterapico.

Numerose sono le pubblicazioni che confermano la possibilità dell'approccio in biopsia liquida in questo campo, come nel caso dello studio condotto nel del 2016 che conferma la possibilità di identificazione di pazienti con maggior rischio di recidiva dopo resezione chirurgica nel cancro colico mediante la rilevazione di ctDNA confermando la capacità del ctDNA nella valutazione e identificazione della MMR. [43]

Infatti, la recidiva si è verificata solo nel 9,8% dei casi con ctDNA negativo.

La rilevazione del ctDNA dopo la resezione del tumore al colon in stadio II fornisce quindi prove dirette della malattia residua e identifica i pazienti a rischio molto elevato di recidiva.

La resistenza farmacologica è inoltre uno dei limiti e delle sfide ancora oggi presenti nel campo dell'oncologia.

È stato dimostrato come, terapie mirate, possono causare lo sviluppo di cloni resistenti per pressione selettiva causando l'insorgenza recidive di difficile trattamento. [44]

Ed è in questo contesto che trova spazio la biopsia liquida, infatti nello studio preso in considerazione, gli alleli mutanti KRAS erano rilevabili nel sangue dei pazienti trattati con cetuximab già 10 mesi prima della documentazione radiografica della progressione della malattia.

In tal senso, l'emergere dei cloni mutanti KRAS può essere rilevata in modo non invasivo mesi prima della progressione radiografica e quindi la conferma dell'analisi del ctDNA come strumento potente di rilevazione di resistenze.

In sintesi, l'analisi qualitativa e/o quantitativa del cfDNA mostra notevole potenziale nella previsione della risposta terapeutica, la rilevazione di malattia minima residua e monitoraggio di recidiva in vari tipi di neoplasie che ne conferma l'estrema utilità dal punto di vista diagnostico predittivo e prognostico.

OBIETTIVO

L'obiettivo di questo lavoro di ricerca è valutare la prevalenza delle mutazioni del gene *ESR1* rilevate tramite biopsia liquida in pazienti con carcinoma mammario metastatico avanzato con progressione sottoposte a terapia con inibitori dell'aromatasi. Lo studio mira a identificare le mutazioni emergenti ed a contestualizzarne la comparsa valutando variabili cliniche e prettamente laboratoristiche, al fine di delineare il quadro biologico e clinico nel quale tali alterazioni si sviluppano e contribuire alla comprensione dell'applicabilità dell'analisi mutazionale mediante Biopsia Liquida nel monitoraggio della malattia metastatica.

L'analisi è stata condotta in un contesto osservazionale, monocentrico e retrospettivo.

I dati derivano da un database di 129 pazienti sottoposte a biopsia liquida tra gennaio 2025 e giugno 2026, con valutazione mutazionale mediante Real-Time PCR.

MATERIALI E METODI

3.1 CAMPIONI

3.1.1 Generale

I campioni presi in analisi per tale ricerca sono campioni di sangue periferico di biopsia liquida.

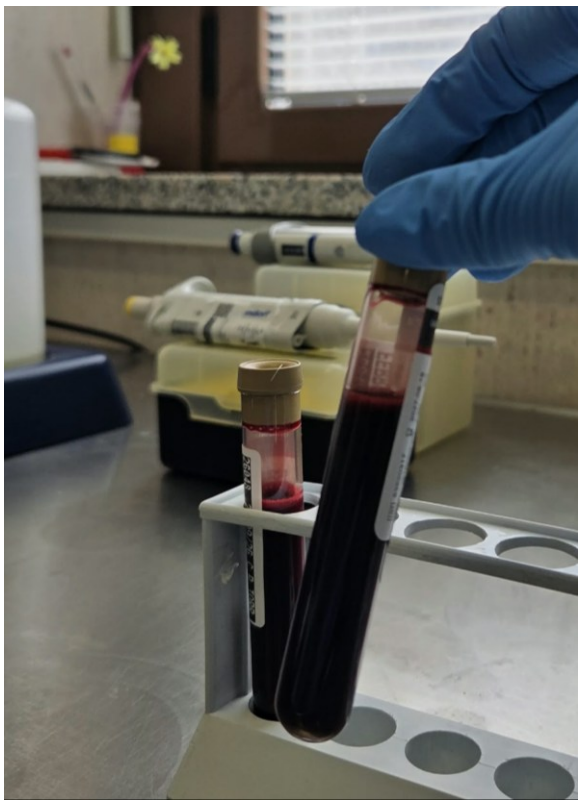


Figura 3-Campione di Biopsia Liquida

La popolazione presa in esame sono donne di età compresa fra i 45 e i 93 anni che presentano pregressa diagnosi di carcinoma della mammella con, attualmente, sospetto clinico di progressione o resistenza terapeutica.

L'obbiettivo dell'analisi è ricercare la presenza o l'assenza di mutazione del gene di resistenza ESR1 nell'acido nucleico contenuto a livello plasmatico.

La presa in carico dei campioni avviene all'interno della SOD di Anatomia Patologica dell'AOUM nel Laboratorio di Biologia Molecolare.

Il laboratorio in generale ha lo scopo di processare i campioni di derivazione neoplastica destinati alla ricerca molecolare degli acidi nucleici per identificare alterazioni genetiche che hanno valore diagnostico, prognostico e predittivo.

I campioni che sono stati presi in esame nel nostro caso sono Biopsie Liquide, campioni di sangue periferico che risultano essere molto più delicati rispetto ai campioni istologici standard che il laboratorio si trova generalmente a manipolare, in quanto l'obbiettivo è la valutazione del ctDNA ed è quindi di primaria importanza evitare la sua degradazione.

Infatti, i fattori preanalitici vanno ad influire in modo critico sull'integrità del ctDNA e quindi la sensibilità e la specificità del saggio, per questo motivo sono necessari protocolli standardizzati adoperati anche nel nostro laboratorio. [45]

3.1.2 Raccomandazioni per una corretta processazione del campione di sangue

- **Provette e Conservante utilizzato**

Le provette utilizzate secondo il protocollo standard sono le *Streck – Cell-Free DNA BCT®* per quanto riguarda la ricerca di ESR1.



Figura 4-Streck

Sono provette allestite allo scopo di raccolta, trasporto e conservazione di plasma per l'analisi del cfDNA.

L'utilità di tali strumenti di supporto è di stabilizzare il DNA plasmatico libero da cellule; infatti, l'accuratezza e la sensibilità dell'analisi del ctDNA può essere compromessa dal trasporto e dalla lavorazione del campione causando lisi delle cellule ematiche con rilascio di nucleasi causando degradazione del DNA libero circolante.

A tale scopo le *Streck – Cell-Free DNA BCT*® contengono K_3EDTA come anticoagulante e un preservante cellulare stabilizzando il campione fino a 7 giorni a temperature comprese tra i 15 e i 30°C.

Molte sono le evidenze scientifiche che permettono di confermare la migliore resa diagnostica nell'utilizzo di provette di raccolta e conservazione adeguate alla corretta profilazione molecolare del ctDNA. [46]

Infatti, con le classiche provette di EDTA l'elaborazione del plasma deve essere effettuata in meno di quattro ore per prevenire il rilascio genomico dovuto alla lisi cellulare e ciò non è sempre compatibile con il normale flusso di lavoro all'interno dei laboratori.

L'utilizzo delle Streck, quindi, permette un ampio intervallo in questione di tempi di lavorazione del campione che garantiscono una maggiore plasticità di processazione.

È sempre importante che il personale infermieristico sia competente in quanto anche durante la fase del prelievo, se non effettuata correttamente, è possibile incorrere ad emolisi e non idoneità del campione.

- **Volume del campione**

Secondo le linee guida interne del laboratorio si considera un volume adeguato di plasma per l'estrazione quello contenuto in due Streck, per un totale di 20ml di sangue all'incirca.

Successivamente alla preliminare processazione del campione, che prevede la plasmatura, il volume di plasma ottimale per la lavorazione, secondo le linee guide standard, sono 4ml. Il restante può essere conservato per eventuali ripetizioni.

È necessario in ogni caso descrivere e trascrivere chiaramente il volume di sangue che giunge in laboratorio e il volume di plasma ottenuto.

- **Conservazione**

Le modalità di conservazione influiscono enormemente sull'integrità e la concentrazione del ctDNA; infatti, temperature elevate potrebbero comportare rottura dei globuli bianchi con conseguente aumento dei cfDNA che va a diminuire sensibilmente l'accuratezza del test.

L'utilizzo di provette con conservante permette un migliore mantenimento dell'integrità del ctDNA nel momento in cui, per questioni organizzative, non è possibile effettuare un'immediata plasmatura del campione di sangue.

Nel nostro laboratorio vengono utilizzate *Streck – Cell-Free DNA BCT®* per la raccolta e la conservazione del sangue che verrà, in ogni caso, processato in mattinata quando il flusso di lavoro lo consente.

3.1.3 Non conformità

Sono moltissime le variabili che possono compromettere la conformità del campione per l'analisi del DNA tumorale circolante:

- **L'emolisi** è una delle principali cause di rigetto dei campioni nei laboratori clinici e rappresenta fino al 70% dei campioni non idonei [47]. La prima causa di emolisi nel caso di prelievo per biopsia liquida è il metodo di raccolta stesso che, in alcuni casi, può essere traumatico e causare rottura dei globuli rossi. Campioni emolizzati, di norma, non possono essere processati in quanto potremmo avere diluizione del contenuto di ctDNA fino a diventare non rilevabile.

- **Quantità** del campione, è necessaria una quantità minima di plasma per effettuare l'isolamento del ctDNA che, secondo i protocolli standard interni, sono 4ml. Per questo motivo campioni di sangue che non garantiscono il corretto quantitativo sono da considerare non conformi

- **Errore nell'identificazione**, l'identificazione errata di una provetta va gestita con l'immediata interruzione della processazione del campione stesso in quanto si potrebbe incorrere a gravissimi errori di refertazione. In tal senso è necessario controllare la corrispondenza dei dati anagrafici del paziente tra la richiesta e la provetta.

3.2 PERCORSO ANALITICO

3.2.1 Pre-Analitica

La fase Pre-Analitica in laboratorio rappresenta un momento cruciale nel processo diagnostico che garantisce la validità e l'affidabilità del risultato dei test.

Questa fase include l'insieme delle attività che concernono l'arrivo, l'accettazione, la conservazione e la preparazione del campione fino all'inizio della vera e propria fase analitica, ovvero dell'analisi del campione.

È ampliamente studiato e confermato come la maggior parte degli errori nel laboratorio dipendono da questa fase, in tal senso è estremamente importante l'attenzione e lo svolgimento delle varie fasi correttamente soprattutto quando tali fasi sono svolte totalmente in maniera manuale.

Nel nostro caso i campioni di biopsia liquida arrivano dal centro prelievi in laboratorio immediatamente dopo la raccolta stessa. Appena giunti è necessario verificare la correttezza e la corrispondenza dei dati anagrafici e del test richiesto, controllare il volume di sangue prelevato e riportarlo nel foglio della richiesta assieme alla data e ora dell'arrivo.

A causa dell'elevata instabilità del campione da analizzare e la rapida degradazione del ctDNA da valutare è necessario elaborare e processare velocemente il campione in modo tale da renderlo pronto per l'estrazione e conservato nel minor tempo possibile.

La problematica del basso range di tempo con cui lavorare è stata di gran lunga superata mediante l'utilizzo delle provette *Streck – Cell-Free DNA BCT®* , anche se in ogni caso si preferisce processare immediatamente il campione.

3.2.1.1 Plasmatura

La plasmatura è la prima fase con la quale si dà inizio alla fase di processazione iniziale del campione.

Per plasmatura si intende l'allontanamento della fase corpuscolata del campione di sangue, mantenendo quindi soltanto il plasma e le componenti che sono in soluzione tra cui il ctDNA di nostro interesse.

Tale fase prevede l'utilizzo di centrifughe specifiche e standardizzate per l'alloggiamento delle *Streck – Cell-Free DNA BCT®*, con la possibilità di mantenere una temperatura compresa fra i 4° C e i 6° C per il mantenimento dell'integrità del campione.

Vengono effettuate due centrifugate distinte, la prima a 3000 RPM per 10 minuti a 4°c e la seconda a 12000 RPM per 5 minuti a 4° C.

Fra la prima e la seconda centrifugata il plasma viene trasferito dalle *Streck* ad una eppendorf da 2ml provvisoria ed identificata che verrà poi sottoposta alla seconda centrifugata. Quest'ultime viene eseguita a maggiori giri per minuto in quanto, mediante la prima plasmatura, sono state allontanate in linea teorica la quasi totalità delle cellule del sangue e in tal senso il rischio della rottura meccanica di queste e il conseguente rilascio di DNA cellulare aspecifico è minore.

Successivamente alla seconda centrifugata è possibile trasferire il plasma, senza disturbare il possibile pellet che si è formato, su apposite eppendorf da 2ml identificate.

È necessario verificare in questa fase la quantità di plasma ottenuto, in quanto la successiva fase di estrazione è ottimizzata e standardizzata per 4ml di plasma. In tal senso è fondamentale che sia garantita la quantità minima di campione da utilizzare e un'ulteriore quantità nel caso in cui siano necessarie ripetizioni.

3.2.1.2 Conservazione

A questo punto il plasma è pronto per essere estratto.

Nella maggior parte dei casi si attende di avere una quantità minima di campioni per procedere allo step successivo e, nel frattempo, è necessario conservare al meglio il campione di plasma purificato per evitare la degradazione del cDNA.

Il mantenimento dell'integrità di questo è garantito mediante conservazione del campione a -20°C in congelatori a temperatura controllata.

3.2.1.3 Estrazione

Per estrazione del DNA si intende quel processo analitico che garantisce la possibilità di allontanare l'acido nucleico di interesse dal nucleo cellulare e isolarlo per poter permettere la successiva analisi molecolare di questo.

La metodica di estrazione in questo caso si allontana molto dalla classica metodica: in questo caso, infatti, il DNA di nostro interesse si trova già libero in soluzione e, in tal senso, è necessario solamente isolarlo dal resto dei componenti del solvente in cui si trova.

Il protocollo interno di estrazione di DNA da plasma utilizza il kit Qiagen di estrazione di DNA circolante da plasma con al suo interno tutti i reagenti necessari per la metodica.[48]



Figura 5-Reagenti del Kit di estrazione

La prima fase prevede la preparazione della miscela di lisi; infatti, gli acidi nucleici circolanti liberi nei fluidi biologici sono solitamente legati a proteine o racchiusi in vescicole; quindi, è necessaria una fase di lisi efficace per rilasciare gli acidi nucleici e permetterne il legame selettivo alla colonna *QIAamp Mini*.

Perciò, i campioni vengono lisati in condizioni altamente denaturanti a temperature elevate in presenza di proteinasi K e Buffer ACL, che insieme assicurano l'inattivazione di DNasi e RNasi e il completo rilascio degli acidi nucleici da proteine legate, lipidi e vescicole.

La miscela di lisi prevede quindi:

- 500µl pK
- 4ml di plasma
- 3,2 ml ACL

Questa viene preparata all'interno di una Falcon la 15ml.

Successivamente si vortexa la falcon con tutti i reagenti e il campione per 30 secondi finché la soluzione non risulta omogenea.

Per una lisi ottimale, a questo punto, si pone il campione in un bagnetto preimpostato a 60° per 60 minuti.

Allo scadere del tempo e tolto il campione dal bagnetto è possibile proseguire con il trattamento del campione per la preparazione all'estrazione. Vengono aggiunti quindi 7,2 ml di ACB che permette il legame ottimale degli acidi nucleici circolanti alla membrana di silice delle *QIAamp Mini*. Successivamente si vortexa per 15-30 secondi per permettere il corretto mescolamento dei reagenti per poi inserire la Falcon in ghiaccio: questo permette la disattivazione della miscela di lisi.

È possibile ora preparare il sistema di estrazione Qiagen. Per il protocollo sono necessari un collettore a vuoto (*QIAvac 24 Plus* con il *QIAvac Connecting System*) e una pompa capace di produrre un vuoto di –800 a –900 mbar (*QIAGEN Vacuum Pump*). Il QIAvac 24 Plus è progettato per un'elaborazione a vuoto rapida ed efficiente di fino a 24 colonne spin QIAGEN in parallelo. I campioni e soluzioni di lavaggio vengono aspirati attraverso le membrane delle colonne grazie al vuoto invece della centrifugazione, che viene utilizzata come metodica standard per l'estrazione di DNA, garantendo maggiore velocità e precisione riducendo il tempo di lavoro nelle procedure di purificazione e lavaggio. Il flusso dei campioni viene poi raccolto in una bottiglia di scarto separata.

Le colonne QIAamp Mini vengono elaborate sul QIAvac 24 Plus usando VacConnectors usa e getta e VacValves riutilizzabili.
Le VacValves vengono inserite direttamente negli slot del QIAvac 24 Plus e garantiscono un flusso costante, facilitando l'elaborazione parallela di campioni di diversa natura, volume o viscosità: queste garantiscono un vuoto uniforme.
I VacConnectors sono connettori usa e getta che si adattano tra le colonne QIAamp Mini e le VacValves, queste prevengono il contatto diretto tra la colonnina e la VacValve durante la purificazione, evitando così qualsiasi contaminazione incrociata tra i campioni.

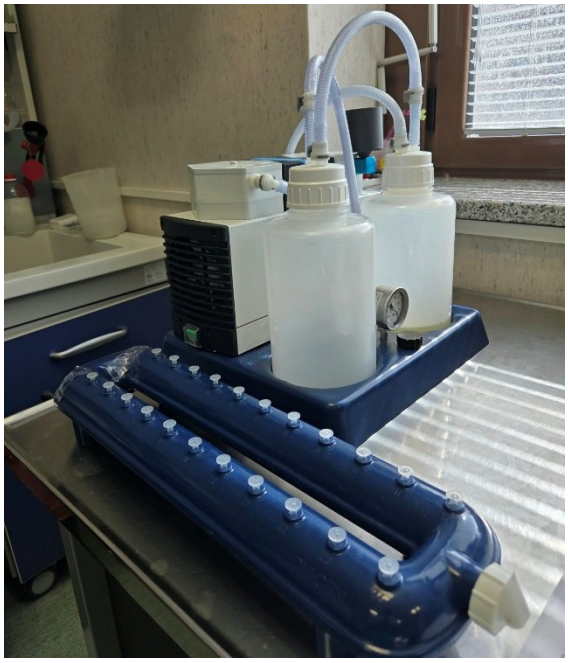


Figura 6-Pompa per l'estrazione

Quindi, per effettuare l'estrazione, sul sistema *QIAvac 24 Plus*:

- Inserire le *QIAiamp Mini column* nel *VacConnector* sul *QIAvac* 24 Plus
- Inserire un tubo da 20ml sopra al *QIAamp Mini column* ed assicurarsi che il montaggio sia avvenuto nella giusta maniera
- Versare la miscela di lisi nel tubo da 20ml
- Accendere la pompa
- Una volta passato tutto il liquido (anche la schiuma) spegnere la pompa, aprire la valvola e lasciare che la pressione scenda, chiudere la valvola
- Aggiungere 600µl di *Buffer ACW1* nella colonna
- Accendere la pompa
- Una volta passato tutto il liquido (anche la schiuma) spegnere la pompa, aprire la valvola e lasciare che la pressione scenda, chiudere la valvola
- Aggiungere 750µl di *Buffer ACW2* nella colonna
- Accendere la pompa
- Una volta passato tutto il liquido (anche la schiuma) spegnere la pompa, aprire la valvola e lasciare che la pressione scenda, chiudere la valvola

- Aggiungere 750µl di etanolo (96-100%)
- Accendere la pompa
- Una volta passato tutto il liquido (anche la schiuma) spegnere la pompa, aprire la valvola e lasciare che la pressione scenda, chiudere la valvola
- Chiudere le *QIAamp Mini column* e sganciarla dal *vacuum manifold*
- Mettere la *QIAiamp Mini column* in una collection tube da 2ml pulita e centrifugare a 14000 RPM per 3 minuti
- Posizionare *le QIAiamp Mini column* con il tappo aperto in una nuova collection tube da 2ml e metterla su un termoblocco a 56° per 10 minuti per far evaporare l'etanolo rimasto
- Aggiungere 65µl di Buffer AVE per eluire il DNA estratto al centro della membrana della elution tube. Chiudere il tappo e lasciare incubare per 3 minuti.
- Centrifugare a 14000 per 1 minuto, buttare la *QIAamp Mini column*, chiudere la elution tube con l'eluito

È fondamentale fare attenzione che tutti i reagenti per il lavaggio siano correttamente preparati:

- Buffer ACB: Prima dell'uso, aggiungere 200 ml di isopropanolo (100%) a 300 ml di concentrato di buffer ACB per ottenere 500 ml di Buffer ACB. Mescola bene dopo aver aggiunto l'isopropanolo.
- Buffer ACW1: Prima dell'uso, aggiungere 25 ml di etanolo (96–100%) a 19 ml di concentrato di buffer ACW1 per ottenere 44 ml di Buffer ACW1. Mescola bene dopo aver aggiunto l'etanolo.
- Buffer ACW2: Prima dell'uso, aggiungi 30 ml di etanolo (96–100%) a 13 ml di concentrato di buffer ACW2 per ottenere 43 ml di Buffer ACW2. Mescola bene dopo aver aggiunto l'etanolo.
- Aggiunta di RNA carrier al Buffer ACL, questo passaggio è necessario per due scopi: primo, migliora il legame degli acidi nucleici con la membrana

QIAamp Mini, soprattutto se nel campione ci sono pochissime molecole target. Secondo, l'aggiunta di grandi quantità di RNA carrier riduce la possibilità di degradazione dell'RNA nell'evento raro che molecole di RNasi sfuggano alla denaturazione da parte dei sali chaotropici e del detergente nel Buffer ACL.

3.2.1.4 Conservazione

In conclusione, alla fase di estrazione si ottengono 65µl di campione con all'interno DNA estratto con concentrazione variabile.

Prima dell'analisi vera e propria si tende ad accumulare una quantità minima di casi in modo tale da evitare sprechi di reagenti, per questo motivo è possibile conservare e mantenere stabile il campione a 4° per 12 ore o a -20° fino al momento dell'analisi.

3.2.1.5 Quantificazione

Per quantificazione si intende la valutazione del campione preliminarmente all'analisi per valutare parametri fondamentali quali quantità e qualità del preparato.
Queste informazioni sono rilevanti a livello diagnostico in quanto ci permettono di capire se la metodica di estrazione è avvenuta in maniera adeguata e di interpretare il dato analitico finale che sarà strettamente correlato alla variazione di questi valori.
La quantificazione nel nostro caso viene effettuata tramite metodica di Real Time con il kit "*EasyPGX® Quantification Kit"*.
L'output della seduta analitica prevederà parametri quali **Quantità** espressa in ng/µl e qualità espressa sotto forma di **Indice di Frammentazione** (>0.5 basso, 0.5-0.3 medio, <0.3 alto).

3.2.2 Analitica

Per fase analitica si intende il momento nel quale si effettua l'analisi vera e propria del campione. Successivamente alla fase preanalitica, ciò che abbiamo ottenuto e che utilizzeremo come substrato per l'analisi sarà cfDNA concentrato, purificato ed eluito in 65µl di Buffer AVE.

La ricerca della presenza o assenza di mutazioni a carico del gene ESR1 avverrà mediante utilizzo del kit "*EasyPGX® ready ESR1",* utile per il rilevamento quantitativo mediante Real Time PCR di 13 mutazioni somatiche specifiche di tale gene, ottimizzato per l'analisi di DNA tumorale circolante estratto da plasma derivato da sangue intero in EDTA oltre che di tessuto FFPE.

Il kit "*EasyPGX® ready ESR1"* presenta al suo interno tutto il necessario per provvedere all'esecuzione di 48 test, permette di amplificare selettivamente il DNA mutato in campioni contenenti una miscela di DNA wild-type e mutato. Il kit prevede l'esecuzione contemporanea di sette saggi per il rilevamento delle mutazioni di ESR1 e un saggio di controllo per la valutazione del contenuto di DNA nel campione. Questo è possibile mediante l'utilizzo in contemporanea di due sonde fluorescenti marcate con FAM, per la valutazione del target mutazionale, ed HEX, per la valutazione di un gene di controllo endogeno che permette di verificare la corretta esecuzione della procedura.

All'interno del kit troviamo:

- **EasyPGX ESR1 strips**

Queste sono strips da 8 posizioni precaricate con tutto il necessario per l'esecuzione dell'amplificazione in formato anidro e stabile a temperatura ambiente (+2/+25°). I componenti all'interno della mix di PCR sono: TaqPolimerasi, Tampone di reazione, dNTPs, $MgCl_2$, primers ESR1, sonde ESR1, fluorescenti ed eccipienti in quantità adeguate.

È possibile riconoscere 8 posizioni, all'interno di ognuna avviene la ricerca di una mutazione diversa, in ordine:

1. ESR1 K303R
2. ESR1 E380Q
3. ESR1 S463P
4. ESR1 L536x, il saggio rileva le mutazioni L536R, L536H, L536P, L536Q senza la possibilità di discriminarle fra loro
5. ESR1 Y537x, il saggio rileva le mutazioni Y537N, Y537H. Y537D, Y537C senza la possibilità di discriminarle fra loro
6. ESR1 Y537S
7. ESR1 D358G
8. ESR1 ctrl, il saggio rileva una regione del gene priva di qualsiasi polimorfismo/mutazione ad oggi conosciuta

- **8-strips flat optical caps**

Tappi DNAasi-RNAasi free utili per richiudere le strips una volta caricato il campione.

- **EasyPGX Pos & Neg Controls**

I controlli all'interno di una seduta analitica sono fondamentali per garantire la corretta lavorazione e validare la seduta. Si lavora con un controllo positivo e uno negativo, il primo contiene una miscela di sequenze di DNA sintetiche che presentano tutte le mutazioni rilevabili dal test e DNA genomico Wild Type.
Per quanto riguarda il controllo negativo prevede al suo interno acqua DNAasi-RNAasi free.

3.2.2.1 Preparazione

È necessario, per la preparazione dei campioni in Biologia Molecolare, riuscire a lavorare in pulizia ed evitare qualsiasi tipo di contaminazione; infatti, le metodiche di rilevazione sono estremamente sensibili e precise ed una sbagliata manipolazione del campione potrebbe comportare il fallimento della seduta analitica.
Per questo motivo si lavora sempre utilizzando i DPI, materiali sterili e monouso come eppendorf e puntali e superfici pulite e disinfettate.

Per la preparazione del campione per l'amplificazione in Real-Time è necessario, in primo luogo, diluire il DNA estratto: in quanto vanno dispensati 25µl in ogni posizione, per un totale di 200µl, si diluiscono 35µl di estratto con 175µl di acqua DNAasi-RNAasi free.
Prima di iniziare la seduta è utile centrifugare per pochi secondi le strips per garantire che il pellet sia depositato a fondo, identificare le strips in modo univoco e preparare il bancone.
È possibile ora dispensare il campione all'interno delle strips: si erogano 25µl di campione in ogni pozzetto facendo attenzione di sostituire il puntale per ogni pozzetto.
Si completano poi le strips per il controllo positivo e negativo con i relativi reagenti.
È possibile ora chiudere le strips con gli appositi tappini verificando che siano correttamente inseriti.
Vortexare e centrifugare ogni strip per pochi secondi, verificare che siano assenti eventuali bolle ed inserire nel termociclatore.
A questo punto è necessario configurare la piastra, nominare la seduta e dare inizio all'amplificazione.

La metodica prevede una prima fase denominata Hot Start che prevede un ciclo a 95° per 5min e 40 cicli di amplificazione che prevedono due fasi alterne: 95° per 15 secondi e 60° per 30 secondi.

3.2.3 Post-Analitica

L'analisi dei risultati viene effettuata automaticamente mediante l'utilizzo di "*EasyPGX Analysis Software*". I file grezzi verranno asportati inizialmente all'interno del programma "*AriaDX"* per poi essere elaborati automaticamente dal software di analisi.

Una volta ottenuto il dato finale e completo, la lettura dei risultati si basa sulla valutazione di alcuni parametri specifici:

- **Controlli**

È necessario, in primo luogo, verificare che i controlli siano usciti nel range atteso. Per quanto riguarda il controllo negativo non deve essere presente nessuna curva di amplificazione, la presenza id amplificazione determina il fallimento della seduta analitica per contaminazione. Nel caso del controllo positivo, questo deve presentare una curva di amplificazione nel range atteso, l'assenza di amplificazione determina il fallimento della seduta analitica e l'impossibilità di refertare i risultati.

- **Curva di amplificazione**

Per curva di amplificazione si intende l'insieme dei parametri che, a livello della seduta analitica, intersecati fra loro porteranno la costruzione della curva: è sulla base di questa che è possibile distinguere un campione positivo da uno negativo.

Il parametro fondamentale che va tenuto in considerazione è il **Ciclo Soglia** (Ct), ovvero il numero di cicli per il quale la curva di amplificazione interseca la **Threshold**, al di sotto del quale ogni segnale è definito come rumore di fondo e non può essere considerato specifico di mutazione. A parità di test diagnostico,

campioni con valore di Ct minore possono essere considerati maggiormente amplificati e con carico mutazionale maggiore.

In secondo luogo, è di fondamentale importanza confrontare il dato ottenuto con i valori di cut-off, ovvero il valore-soglia stabilito dal produttore del kit diagnostico utile per decidere se un risultato è da considerare positivo, negativo o non interpretabile.

Per ogni saggio esistono valori di cut-off diverso, ovvero quel ciclo soglia al di sopra del quale si considera esito negativo, ovvero assenza di mutazione.

Saggio	**Cq FAM**
K303R	≤34.0
E380Q	≤34.0
S463P	≤33.5
L536x	≤34.0
Y537x	≤36.0
Y537S	≤36.0
D538G	≤35.0

Tabella 7-Cut-off saggio ESR1

Per valori di Ct minori del cut-off è possibile confermare l'avvenuta amplificazione del DNA del campione e di conseguenza la presenza di mutazione.

Per valori di Ct maggiori del cut-off si considera il ciclo soglia troppo elevato per poter considerare il campione amplificato, e in tal senso si dà esito negativo al test.

RISULTATI

Dei 129 casi in cui lo stato mutazionale è stato richiesto al laboratorio, sono risultati mutati 39 di 129 casi pari al 30,23%.

Nel confronto tra i due anni oggetto di studio emerge che il numero di casi testati nel 2025 è stato maggiore, ma con una frequenza di esito mutato inferiore (pari al 26.6%) rispetto all'anno 2026 (anno parziale).

Nonostante il numero dei casi testato sia maggiore nel 2025, la percentuale di positività maggiore si è riscontrata nella prima parte dell'anno 2026 con una percentuale di casi mutati del 40% (14 su 35) rispetto ai casi dell'anno precedente dei quali si riscontra una prevalenza del 29,59% (25 su 94).

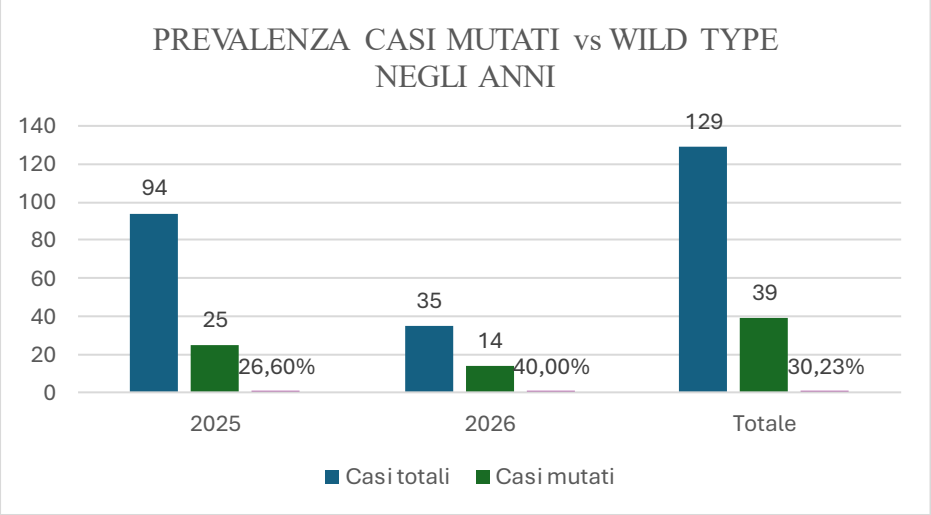


Tabella 8- Prevalenza casi mutati vs wild type negli anni

Per quanto riguarda la frequenza delle varie forme mutazionali del gene riscontriamo, si riscontra una netta prevalenza della forma mutazionale amminoacidica D538G nel 2026, mentre nell'anno precedente la forma più frequente risulta essere la Y537S.

Nel complesso queste due forme sono quelle maggiormente riscontrate e trovano, nel totale del periodo preso in considerazione, una prevalenza identica di 17 casi

ciascuno, a differenza delle altre che trovano spazio marginale nel quadro completo.

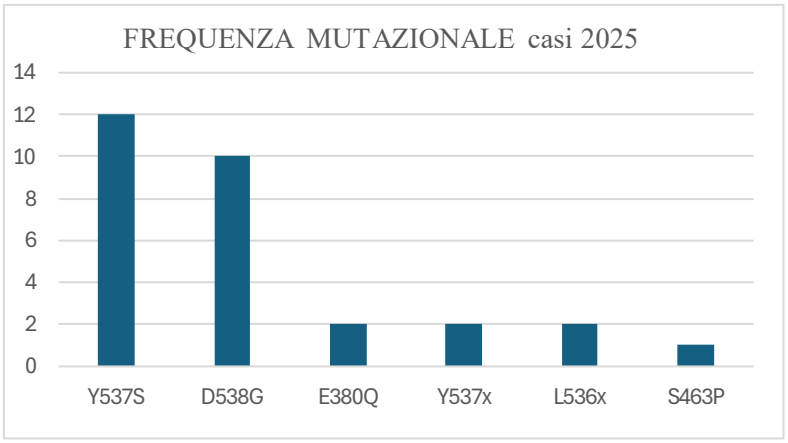


Tabella 9-Frequenza mutazionale casi 2025

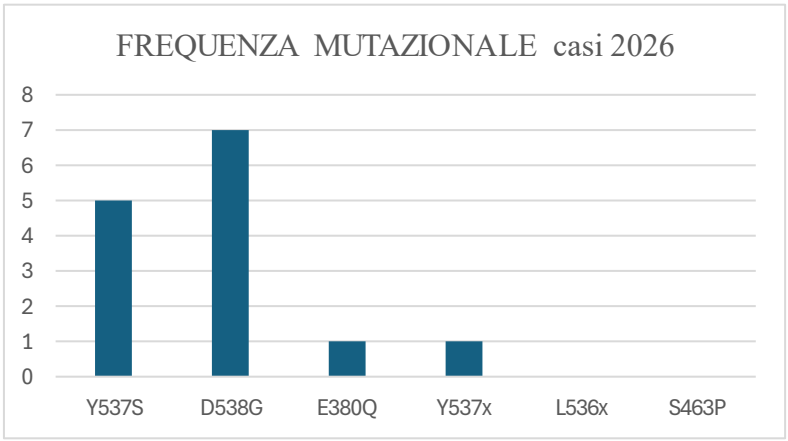


Tabella 10-Frequenza mutazionale casi 2026

Inoltre, è emerso come la concentrazione del cfDNA nel campione incide sul riscontro di mutazione presente o assente.

L'analisi delle concentrazioni rilevate nei gruppi *Mutato* e *Wild Type* nei due anni considerati evidenzia differenze significative sia nei valori centrali sia nella variabilità delle distribuzioni. Nel complesso, il 2025 mostra un quadro caratterizzato da concentrazioni più elevate e da una marcata eterogeneità

biologica (mediana pari a circa 2.65 e outlier estremi che raggiungono valori superiori a 12 ng/mL nei casi mutati), mentre il 2026 presenta valori più contenuti e una dispersione nettamente inferiore (nei mutati la mediana si attesta intorno a 1.50, con quartili più ravvicinati e outlier meno estremi).

Nei casi del 2025 è possibile osservare una marcata differenza nelle concentrazioni tra i campioni mutati e quelli wild type. Le concentrazioni significativamente più elevate nel gruppo Mutato suggeriscono un maggiore carico mutazionale, che rende più agevole la rilevazione della mutazione genica mediante biopsia liquida. Questo dato conferma come quantità più alte di ctDNA e una maggiore presenza dell'allele mutato influenzino positivamente la sensibilità analitica della metodica, facilitando l'identificazione delle mutazioni ESR1.

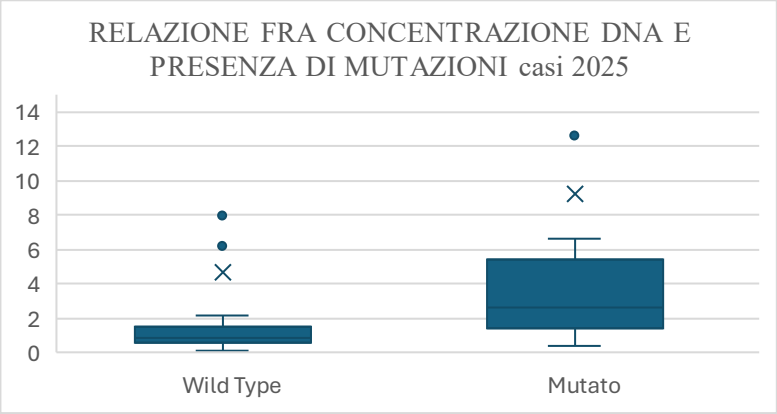


Tabella 11-Relazione fra concentrazione DNA e mutazione casi 2025

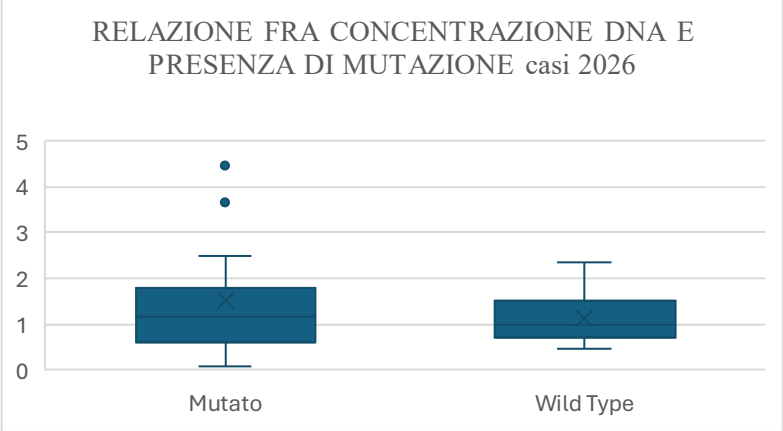


Tabella 12-Relazione fra concentrazione DNA e mutazione casi 2026

Un altro parametro fondamentale che è stato possibile valutare è l'anno di prima diagnosi. Questo ci permette di definire indirettamente il tempo di storia clinica dei pazienti e, di conseguenza, stimare quanto tempo possa essere intercorso tra la diagnosi iniziale e lo sviluppo di resistenza endocrina mediata da mutazioni del gene *ESR1*.

Nel 2025 è presente una quota molto elevata di diagnosi relativamente recenti, rappresentate da una prevalenza del 70% sul totale, anche se, a differenza dei casi del 2026, è possibile riscontrare anche prime diagnosi più datate (1990-2002), suggerendo una storia clinica più lunga e una maggiore esposizione cumulativa alle terapie endocrine, condizioni che favoriscono la selezione di cloni resistenti.

Nei casi del 2026 invece la distribuzione risulta essere molto omogenea con pari prevalenza fra diagnosi più e meno datate rispetto ai periodi di tempo presi in considerazione.

Complessivamente, la maggiore eterogeneità temporale del 2025 si associa a una variabilità più ampia nel rischio di sviluppo di mutazioni ESR1, mentre il 2026 presenta un quadro più stabile e meno influenzato da diagnosi molto lontane nel tempo.

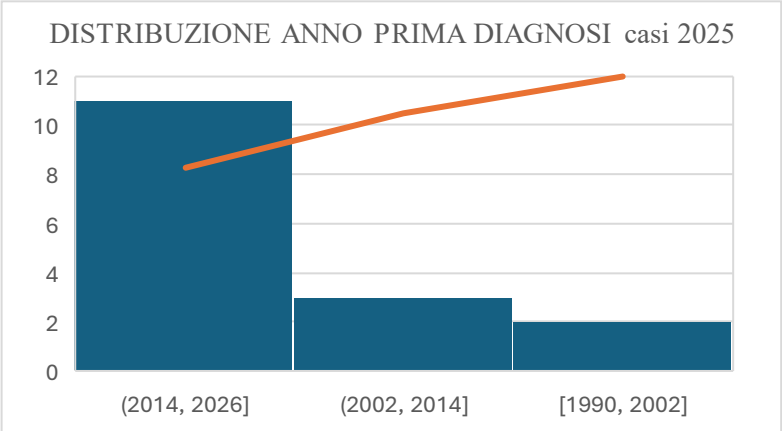


Tabella 13-Distribuzione anno prima diagnosi casi 2025

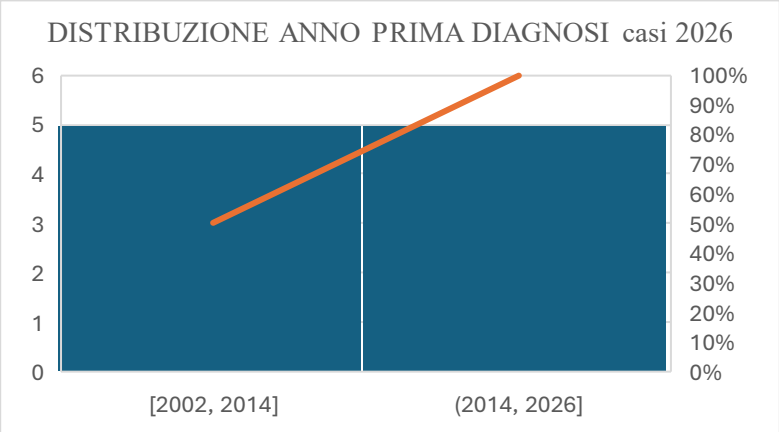


Tabella 14-Distribuzione anno prima diagnosi casi 2026

È stato possibile, inoltre, grazie ai dati raccolti, valutare se l'età delle pazienti al momento dell'analisi potesse essere un parametro che influente sul risultato. In entrambi gli anni, le distribuzioni di età nei gruppi *Mutato* e *Wild Type* risultano molto simili, con valori quali media e mediana quasi sovrapponibili. Questo suggerisce che, nella popolazione analizzata, l'età non rappresenta un fattore discriminante nella comparsa della mutazione ESR1, almeno nei due anni considerati. In entrambi gli anni è possibile notare una condizione analoga, la media e la mediana dell'età fra il gruppo mutato e wild type risultano avere valori molto simili. La presenza di valori massimi elevati (fino a 89 anni) in entrambi i gruppi conferma che la mutazione ESR1 può emergere anche in pazienti anziani, ma non in modo preferenziale rispetto ai wild type.

Questi dati suggeriscono che l'età non rappresenta un fattore associato alla comparsa delle mutazioni ESR1, confermando che la resistenza endocrina è più probabilmente correlata alla storia clinica, alla durata dell'esposizione ai trattamenti e al carico mutazionale, piuttosto che all'età anagrafica della paziente.

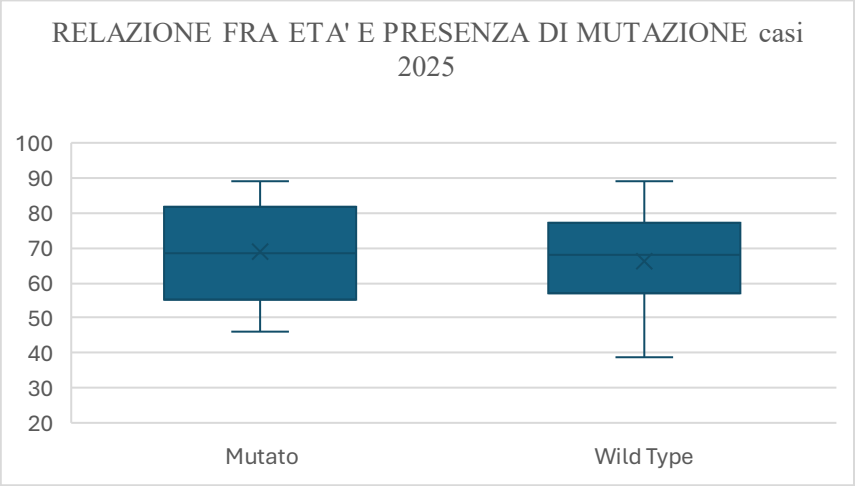


Tabella 15-Relazione fra età e mutazione, casi 2025

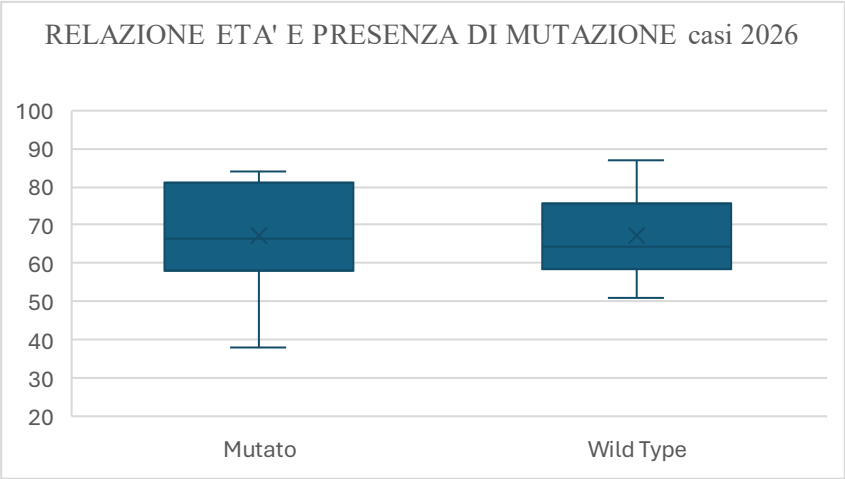


Tabella 16-Relazione fra età e mutazione, casi 2026

Mediante la valutazione dei dati a disposizione, è stato possibile effettuare una valutazione della prevalenza dei diversi istotipi tumorali nelle neoplasie primitive in pazienti che hanno successivamente sviluppato mutazione genica di ESR1.

Nel 2025 la prevalenza risulta essere del tutto equilibrata, circa la metà del totale è rappresentata da carcinoma infiltrate non ulteriormente specificato, mentre gli istotipi duttale e lobulare invece si distribuiscono con proporzioni simili.

Nel primo semestre preso in esame del 2026 si osserva una variazione significativa della prevalenza: l'istotipo duttale infiltrante è rappresentato in quota maggiore mentre le altre due forme subiscono una notevole riduzione.

Questa tendenza suggerisce che, nella forma istotipica del carcinoma alla mammella di tipo duttale infiltrante, lo sviluppo e la selezione di cloni mutanti possa essere favorito. Tuttavia, pur evidenziando l'associazione, non è possibile stabilire una connessione causale netta sulla base dei dati disponibili.

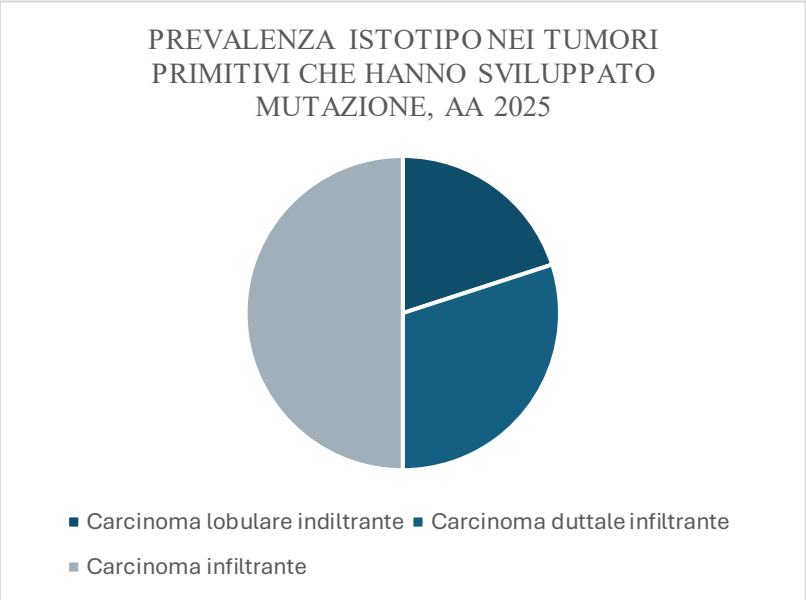


Tabella 17--Prevalenza dell'istotipo nei tumori primitivi che hanno sviluppato mutazione, casi 2025

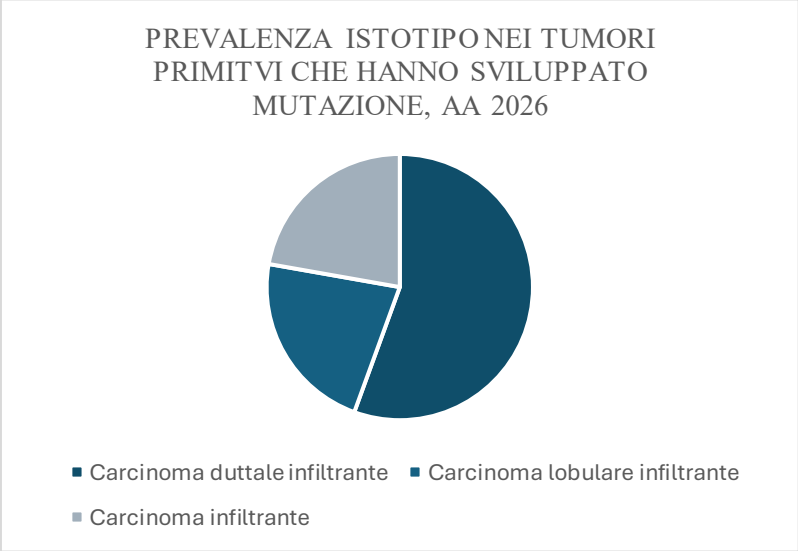


Tabella 18-Prevalenza dell'istotipo nei tumori primitivi che hanno sviluppato mutazione, casi 2026

Infine, uno dei parametri maggiormente rilevanti nello studio che è stato possibile valutare è l'espressione recettoriale estrogenica nei primi tumori trattati dei quali poi è stata rilevata progressione.

L'analisi dell'espressione recettoriale estrogenica (ER%) nei primi tumori trattati nei casi che successivamente hanno sviluppato mutazione ESR1 evidenzia un quadro molto interessante: in entrambi gli anni considerati, l'espressione estrogenica risulta marcatamente elevata, confermando che la mutazione ESR1 tende a emergere in tumori fortemente ER-dipendenti, cioè in neoplasie che si presume abbiano ricevuto una pressione selettiva significativa da parte delle terapie endocrine. In entrambi gli anni la distribuzione risulta essere molto compatta ed omogenea, con valori molto elevati. Questo suggerisce una popolazione clinica ancora più uniformemente caratterizzata da tumori ad altissima espressione estrogenica, confermando che la mutazione ESR1 emerge preferenzialmente in contesti di forte dipendenza ormonale.

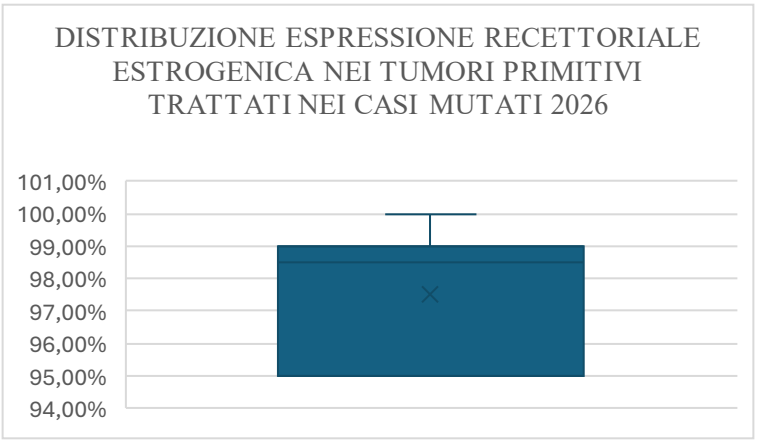


Tabella 19-Distribuzione espressione estrogenica, casi 2026

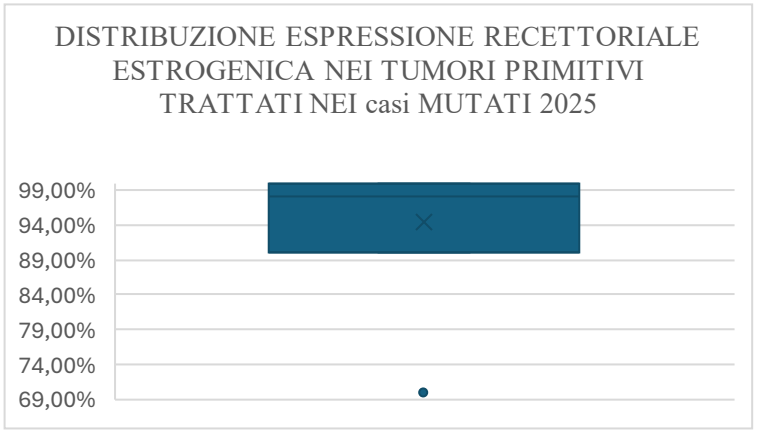


Tabella 20-Distribuzione espressione estrogenica, casi 2025

DISCUSSIONE

Nel complesso, i risultati ottenuti risultano essere coerenti con la letteratura e con la biologia evolutiva del carcinoma mammario ER-positivo.

Mediante lo studio dei dati raccolti nei due anni è stato possibile riscontrare delle differenze nette relative alla quantità di dati disponibili e anche al miglioramento delle tecniche analitiche stesse.

La prevalenza delle mutazioni ESR1 (30%), osservate nel periodo di studio, si colloca perfettamente in linea con quanto riportato in letteratura: tali mutazioni, infatti, emergono in una percentuale compresa fra il 20% e il 40% con prevalenza diversa riscontrata nei due anni in esame. La differenza di prevalenza annuale può essere definita come una variazione epidemiologica della mutazione determinata da una possibile evoluzione del profilo clinico dei pazienti sottoposti all'analisi oltre all'aumento della sensibilità della tecnica analitica utilizzata.

Per quanto riguarda la forma mutazionale, risultano come predominanti le forme D538G e Y537S. Tali mutazioni sono riconosciute in letteratura come le più frequenti e, in tal senso, biologicamente rilevanti in quanto comportano la stabilizzazione del dominio LBD del recettore conferendo resistenza ai farmaci anti-estrogenici. Nel complesso queste due forme risultano essere equilibrate in prevalenza confermando la distribuzione mutazionale tipica dei tumori endocrino-resistenti. Le altre forme amminoacidiche, in netta minoranza, possono essere in ogni caso sviluppate ed emerse in funzione della durata e il tipo di terapia ricevuta.

Il parametro della concentrazione è risultato strettamente correlato con la sensibilità della tecnica analitica: è stato confermato mediante i dati disponibili come una maggior concentrazione di cfDNA nel campione estratto possa aumentare notevolmente la sensibilità della tecnica analitica rendendo le mutazioni maggiormente rilevabili in quanto, una quantità maggiore di cfDNA, può essere associata a carico mutazionale maggiore. Infatti, è sostenuto anche dalla letteratura

come un maggior turnover cellulare, quindi maggiore aggressività della neoplasia, possa influenzare positivamente il rilascio di ctDNA permettendo l'aumento della concentrazione plasmatica di questo. Tale dato ci conferma come la biopsia liquida sia particolarmente efficace nei contesti di malattia avanzata ponendosi come potente sostituto alle tecniche di rilevazione classiche come la biopsia tissutale.

Per quanto riguarda i parametri clinici che sono stati messi in discussione è stato valutato come la storia clinica della paziente e l'età potessero influire sullo stato mutazionale della neoplasia: per quanto riguarda la storia clinica, più precisamente il tempo intercorso fra la diagnosi istologica di tumore primitivo e il riscontro di mutazione mediante biopsia liquida, è stato possibile confermare che nella maggior parte dei casi la diagnosi primaria risale a molti anni precedenti, fino a diagnosi molto datate risalenti agli anni '90. Questo dato suggerisce la rilevanza che ha la storia clinica sullo sviluppo di mutazioni di resistenza ESR1 in quanto, una storia clinica più lunga temporalmente si associa ad una prolungata esposizione alle terapie endocrine, condizione che è stata confermata come fattore predisponente e favorente la selezione di cloni mutanti ESR1.

Il parametro clinico dell'età in realtà non valore rilevante o discriminante: non sono state evidenziate differenze significative di età fra il gruppo Mutato e Wild Type e questo dato, coerentemente con la letteratura, conferma come la resistenza endocrina sia un fenomeno biologico e influenzato dalle terapie e non dall'età anagrafica del paziente. La presenza di casi mutati in pazienti molto anziane conferma come la selezione clonale possa avvenire indipendentemente dall'età purché vi sia una sufficiente durata della malattia, esposizione ai trattamenti e pressione selettiva endocrina.

Inoltre, è stato possibile osservare la variazione di prevalenza delle forme istotipiche dei tumori primitivi che, sotto pressione selettiva hanno poi sviluppato mutazione ESR1. Tramite la variazione osservata nei due anni presi in considerazione, si è registrato un prevalere dei casi di istotipo "carcinoma alla mammella duttale di tipo infiltrante". Infatti, tale istotipo è noto per presentare

maggiore eterogeneità genetica e instabilità genomica che causano maggiore probabilità di evoluzione clonale. Sebbene i dati non consentano di stabilire una relazione causale, la tendenza osservata è coerente con la biologia dell'istotipo menzionato.

Infine, uno dei parametri più importanti dell'intero studio che conferma il contesto biologico nel quale le mutazioni si sviluppano: l'espressione di recettoriestrogenica dei tumori primitivi. È stato confermato mediante i dati disponibili come le mutazioni ESR1 emergano quasi esclusivamente in neoplasie con altissima espressione estrogenica con distribuzioni molto compatte, il che suggerisce quindi la strategia terapeutica che può essere stata adottata. Infatti, nei casi che sono stati selezionati, il tumore primitivo risulta essere fortemente ER-dipendente, questo suggerisce come la pressione selettiva delle terapie endocrine possa essere stata estremamente elevata e abbia influito sulla selezione dei cloni mutanti. Un tumore con ER% molto alto è per definizione fortemente dipendente dal segnale estrogenico per la proliferazione e sopravvivenza, utilizzare quindi una terapia endocrina comporta la ricerca, da parte delle cellule tumorali, di strategie di escape per mantenere attiva la via estrogenica anche in assenza dei ligandi stessi. Per questo motivo, in linea con la letteratura, è possibile confermare questa tendenza anche nei casi interni dell'ospedale della AOUM rendendo il meccanismo universalmente confermato e scientificamente provato.

CONCLUSIONI

Il lavoro svolto dimostra come la biopsia liquida rappresenti uno strumento di particolare interesse applicato nel contesto dello studio mutazionale del gene ESR1 per la diagnosi e il monitoraggio rapido, precoce, dinamico e mininvasivo di metastasi e progressione del carcinoma della mammella in seguito a resistenza endocrina.

L'applicabilità e la funzionalità della metodica sono affermate dalla letteratura e confermate nel nostro contesto dai risultati ottenuti dall'analisi dei dati disponibili.

La metodica è perfettamente in linea con l'obbiettivo diagnostico, soprattutto grazie alla sensibilità del test e le informazioni che possono essere ottenute da questo. Nonostante i risultati ottenibili, è indispensabile però valutare la variabilità della concentrazione del cfDNA nel campione, in quanto è stato riscontrato come la variazione di questo può influire sulla sensibilità del test.

Inoltre, la valutazione dei casi giunti in laboratorio nel range di tempo preso in considerazione ha permesso di delineare e confermare, coerentemente con la letteratura, il quadro biologico e clinico per il quale la malattia evolve e progredisce, con l'analisi di parametri quali: storia clinica, sensibilità ormonale della neoplasia, istotipo ed età dei pazienti.

La prevalenza delle varianti amminoacidiche osservata è in linea con quanto riportato in letteratura e supporta il ruolo di tali alterazioni come possibile meccanismo di resistenza acquisito a pressione selettiva della terapia endocrina.

In questo contesto quindi, l'integrazione della biopsia liquida per la valutazione del gene ESR1 nella gestione del carcinoma mammario metastatico e nel monitoraggio della resistenza endocrina favorisce un maggior dinamismo nell'approccio diagnostico favorendo, in conclusione, una diagnosi più rapida, specifica e sensibile.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. AIOM – Associazione Italiana di Oncologia Medica. I numeri del cancro in Italia 2025. https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2025/12/2025_NDC_web.pdf
2. American Cancer Society. Key statistics for breast cancer. https://www.cancer.org/cancer/types/breast-cancer/key-statistics.html
3. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women: Principal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. JAMA. 2002;288(3):321–333. doi:10.1001/jama.288.3.321
4. AIOM – Associazione Italiana di Oncologia Medica. Linee guida: Neoplasie della mammella. Edizione 2020. https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2020/10/2020_LG_AIOM_NeoplasieMammella.pdf
5. Collegio Italiano dei Senologi. CIS – TNM 2019. https://www.senologia.it/wp-content/uploads/2019/09/CIS-TNM-2019-2.pdf
6. Manuali MSD. Carcinoma della mammella. Manuale MSD Edizione Professionisti. https://www.msdmanuals.com/it/professionale/oncologia/carcinoma-della-mammella/carcinoma-della-mammella
7. Fondazione Umberto Veronesi. Cosa sono le metastasi. https://www.fondazioneveronesi.it/educazione-alla-salute/cosa-sono-i-tumori/cosa-sono-le-metastasi
8. Fondazione Umberto Veronesi, Tumore al seno metastatico: sintomi, cause e terapie https://www.fondazioneveronesi.it/educazione-alla-salute/guida-ai-tumori/tumore-al-seno-metastatico?utm_source=copilot.com
9. Bartkowiak-Wieczorek J, Jaros A, Gajdzińska A, Wojtyła-Buciora P, Szymański I, Szymaniak J, Janusz W, Walczak I, Jonaszka G, Bienert A. The Dual Faces of Oestrogen: The Impact of Exogenous Oestrogen on the Physiological and Pathophysiological Functions of Tissues and Organs. Int J Mol Sci. 2024 Jul 26;25(15):8167. doi: 10.3390/ijms25158167. PMID: 39125736; PMCID: PMC11311417.
10. David G. DeNardo, Hee-Tae Kim, Susan Hilsenbeck, Valerie Cuba, Anna Tsimelzon, Powel H. Brown, Global Gene Expression Analysis of Estrogen Receptor Transcription Factor Cross Talk in Breast Cancer: Identification of Estrogen-Induced/Activator Protein-1-Dependent

Genes, Molecular Endocrinology, Volume 19, Issue 2, 1 February 2005, Pages 362–378
11. Gagliano M. Aromatasi. Chimicamo. 11 novembre 2024. Aromatasi - Chimicamo
12. Habibur P Rahman, Johannes Hofland, Paul A Foster; In touch with your feminine side: how oestrogen metabolism impacts prostate cancer. Endocr Relat Cancer 1 June 2016; 23 (6): R249–R266.
13. Miziak, P., Baran, M., Błaszczak, E., Przybyszewska-Podstawka, A., Kałafut, J., Smok-Kalwat, J., Dmoszyńska-Graniczka, M., Kiełbus, M., & Stepulak, A. (2023). Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer. Cancers, 15(19), 4689. https://doi.org/10.3390/cancers15194689
14. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. Lancet Oncol. 2012;13(11):1141-1151. doi:10.1016/S1470-2045(12)70425-4.
15. Banfi D. Lotta al cancro: tutti i successi dal 1900 ad oggi. Fondazione Umberto Veronesi; 1 febbraio 2019. https://www.fondazioneveronesi.it/magazine/oncologia/lotta-al-cancro-tutti-i-successi-dal-1900-ad-oggi
16. Vuga M. La terapia ormonale dei tumori. Fondazione AIRC per la Ricerca sul Cancro; aggiornato il 8 gennaio 2025. https://www.airc.it/cancro/affronta-la-malattia/guida-alle-terapie/la-terapia-ormonale-dei-tumori
17. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, Vogel V, Robidoux A, Dimitrov N, Atkins J, Daly M, Wieand S, Tan-Chiu E, Ford L, Wolmark N. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. J Natl Cancer Inst. 1998 Sep 16;90(18):1371-88. doi: 10.1093/jnci/90.18.1371. PMID: 9747868.
18. Merlotti, Daniela, Gennari, Luigi, Stolakis, Konstantinos, Nuti, Ranuccio, Aromatase Activity and Bone Loss in Men, Journal of Osteoporosis, 2011, 230671, 11 pages, 2011. https://doi.org/10.4061/2011/230671
19. AIMAC – Associazione Italiana Malati di Cancro. Anastrozolo. Ultima revisione: novembre 2010. https://www.aimac.it/farmaci-tumore/terapia-ormonale/anastrozolo
20. AIMAC – Associazione Italiana Malati di Cancro. Exemestane. Ultima revisione: novembre 2010. https://www.aimac.it/farmaci-tumore/terapia-ormonale/exemestane
21. Neupane, N.; Bawek, S.; Gurusinghe, S.; Ghaffary, E.M.; Mirmosayyeb, O.; Thapa, S.; Falkson, C.; O'Regan, R.; Dhakal, A. Oral SERD, a Novel

Endocrine Therapy for Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. Cancers 2024, 16, 619. https://doi.org/10.3390/cancers16030619
22. UniProt Consortium. ESR1 – Estrogen receptor (Homo sapiens). UniProtKB; entry P03372. ESR1 - Estrogen receptor - Homo sapiens (Human) | UniProtKB
23. Miziak P, Baran M, Błaszczak E, Przybyszewska-Podstawka A, Kałafut J, Smok-Kalwat J, Dmoszyńska-Graniczka M, Kiełbus M, Stepulak A. Segnalazione dei recettori degli estrogeni nel cancro al seno. Cancro (Basilea). 23 settembre 2023; 15(19):4689. doi: 10.3390/cancers15194689. PMID: 37835383; PMCID: PMC10572081.
24. Grinshpun A, Chen V, Sandusky ZM, Fanning SW, Jeselsohn R. ESR1 activating mutations: From structure to clinical application. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2023 Jan;188830. doi:10.1016/j.bbcan.2022.188830.
25. Eckert RL, Mullick A, Rorke EA, Katzenellenbogen BS. Sintesi e ricambio dei recettori degli estrogeni nelle cellule del cancro al seno MCF-7 misurate tramite una tecnica di spostamento di densità. Endocrinologia. Febbraio 1984; 114(2):629-37. doi: 10.1210/endo-114-2-629. PMID: 6690295.
26. Ross-Innes CS, Stark R, Teschendorff AE, Holmes KA, Ali HR, Dunning MJ, Brown GD, Gojis O, Ellis IO, Green AR, Ali S, Chin SF, Palmieri C, Caldas C, Carroll JS. Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. Nature. 2012 Jan 4;481(7381):389-93. doi: 10.1038/nature10730. PMID: 22217937; PMCID: PMC3272464.
27. Marcela Carausu, François-Clément Bidard, Celine Callens, Samia Melaabi, Emmanuelle Jeannot, Jean-Yves Pierga & Luc Cabel (2019): ESR1 mutations: a new biomarker in breast cancer, Expert Review of Molecular Diagnostics, DOI: 10.1080/14737159.2019.1631799
28. Martinez T, Wegner S, Bahmad HF. ESR1 mutations in ER-positive breast cancer: from endocrine resistance to ctDNA-guided therapeutic interception. Explor Target Antitumor Ther. 2026;7:1002375.
29. Guowei Gu, Lin Tian, Meng Gao, Yassine Rechoum, Luca Gelsomino, Derek Dustin, Arnoldo Corona-Rodriguez, Amanda R. Beyer, Anna Tsimelzon, Xiang Zhang, Sebastiano Ando', Suzanne Fuqua. The Y537S ESR1 mutation is a dominant driver of distant ER-positive breast cancer metastasis [abstract]. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018; 2018 Apr 14-18; Chicago, IL. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2018;78(13 Suppl):Abstract nr 22.
30. Jeselsohn R, Buchwalter G, De Angelis C, Brown M, Schiff R. Mutazioni ESR1—un meccanismo per la resistenza endocrina acquisita nel cancro al seno. Nat Rev Clin Oncol. Ottobre 2015; 12(10):573-83. doi:

10.1038/nrclinonc.2015.117. Epub 30 giugno 2015. PMID: 26122181; PMCID: PMC4911210.
31. Robinson DR, et al. Attivazione delle mutazioni ESR1 nel cancro metastatico al seno resistente agli ormoni. Nat Genet. 2013; 45:1446–51. doi: 10.1038/ng.2823.
32. Toy W, et al. Mutazioni del dominio di legame al ligando ESR1 nel cancro al seno resistente agli ormoni. Nat Genet. 2013; 45:1439–45. doi: 10.1038/ng.2822
33. Turner NC, Kingston B, Kilburn LS, Kernaghan S, Wardley AM, Macpherson IR, et al. Circulating tumour DNA analysis to direct therapy in advanced breast cancer (plasmaMATCH): a multicentre, multicohort, phase 2a, platform trial. Lancet Oncol. 2020;21:1296–308
34. Rohatgi N, Limaye S, Vaid AK, Bahl A, Choudhary RK, Kulkarni SS, et al. Molecular profiling in ABC: Is complementary testing with tissue and plasma necessary and clinically relevant? J Clin Oncol. 2024; 42:e12566
35. Peng Y, Mei W, Ma K and Zeng C (2021) Circulating Tumor DNA and Minimal Residual Disease (MRD) in Solid Tumors: Current Horizons and Future Perspectives. Front. Oncol. 11:763790. doi: 10.3389/fonc.2021.763790
36. Ma L, Guo H, Zhao Y, Liu Z, Wang C, Bu J, Sun T, Wei J. Liquid biopsy in cancer current: status, challenges and future prospects. Signal Transduct Target Ther. 2024 Dec 2;9(1):336. doi: 10.1038/s41392-024-02021-w. PMID: 39617822; PMCID: PMC11609310.
37. Lawrence R, Watters M, Davies CR, Pantel K, Lu YJ. Cellule tumorali circolanti per la diagnosi precoce di tumori clinicamente rilevanti. Nat Rev Clin Oncol. Luglio 2023; 20(7):487-500. doi: 10.1038/s41571-023-00781-y. Epub 2 giugno 2023. PMID: 37268719; PMCID: PMC10237083.
38. Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, van den Boom D, Bombard AT, Deciu C, Grody WW, Nelson SF, Canick JA. Sequenziamento del DNA del plasma materno per rilevare la sindrome di Down: uno studio internazionale di validazione clinica. Genet Med. 2011 Nov; 13(11):913-20. doi: 10.1097/GIM.0b013e3182368a0e. PMID: 22005709.
39. Otandault A, Anker P, Al Amir Dache Z. Recent advances in circulating nucleic acids in oncology. Annals of Oncology, 30, 374-384
40. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, Gongora C, Thierry AR. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. PLoS One. 2011;6(9):e23418. doi: 10.1371/journal.pone.0023418. Epub 2011 Sep 6. PMID: 21909401; PMCID: PMC3167805.

41. Thierry AR, El Messaoudi S, Mollevi C, Raoul JL, Guimbaud R, Pezet D, et al. Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment. Ann Oncol. 2017;28(9):2149-2159. doi:10.1093/annonc/mdx330.
42. Keller L, Guibert N, Casanova A, Brayer S, Farella M, Delaunay M, Gilhodes J, Martin E, Balagué G, Favre G, Pradines A, Meyer N. Le prime variazioni del DNA tumorale circolante prevedono la risposta tumorale nei pazienti con melanoma trattati con immunoterapia. Acta Derm Venereol. 1 febbraio 2019; 99(2):206-210. doi: 10.2340/00015555-3080. PMID: 30393817.
43. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, Silliman N, Tacey M, Wong HL, Christie M, Kosmider S, Skinner I, Wong R, Steel M, Tran B, Desai J, Jones I, Haydon A, Hayes T, Price TJ, Strausberg RL, Diaz LA Jr, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Gibbs P. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. Sci Transl Med. 2016 Jul 6;8(346):346ra92. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf6219. PMID: 27384348; PMCID: PMC5346159.
44. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, Bencardino K, Cercek A, Chen CT, Veronese S, Zanon C, Sartore-Bianchi A, Gambacorta M, Gallicchio M, Vakiani E, Boscaro V, Medico E, Weiser M, Siena S, Di Nicolantonio F, Solit D, Bardelli A. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. Nature. 2012 Jun 28;486(7404):532-6. doi: 10.1038/nature11156. PMID: 22722830; PMCID: PMC3927413.
45. Lockwood, C. M., Borsu, L., Cankovic, M., Temple-Smolkin, R. L., Terraf, P., Tsimberidou, A. M., et al. (2023). Recommendations for cell-free DNA assay validations: A joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. **The Journal of Molecular Diagnostics, 25**(12), 876–897. Recommendations for Cell-Free DNA Assay Validations - The Journal of Molecular Diagnostics
46. Diaz, I.M.; Nocon, A.; Sospeso, S.A.E.; Kobilay, M.; Skowasch, D.; Bronkhorst, A.J.; Ungerer, V.; Fredebohm, J.; Diehl, F.; Holdenrieder, S.; et al. Valutazione pre-analitica dei tubi di raccolta del sangue di DNA senza cellule di Streck per profilazione liquida in oncologia. Diagnostica **2023**, 13, 1288. https://doi.org/10.3390/diagnostics13071288

47. Lippi, G., Blanckaert, N., Bonini, P., Green, S., Kitchen, S., Palicka, V., Vassault, A. J., & Plebani, M. (2008). Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 46(6), 764–772. (PDF) Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories
48. QIAGEN. QIAamp MinElute ccfDNA Kits Handbook (Version HB-2366-004; 2020).