

# Indice

1. Introduzione.....	2
2. Principali marcatori molecolari oncologici .....	3
2.1 Tumore del polmone non a piccole cellule .....	3
2.2 Tumore al colon retto .....	8
2.3 Melanoma .....	12
2.4 Tumore del pancreas esocrino .....	16
2.5 Glioblastoma.....	19
2.6 Tumore della mammella.....	21
2.7 Tumore dell'endometrio e dell'ovaio .....	24
2.8 Tumore della prostata .....	27
3. Scopo dello studio.....	30
4. Materiali e metodi.....	32
4.1 Estrazione DNA e RNA da materiale FFPE .....	32
4.2 Estrazione cfDNA da prelievo venoso .....	34
4.3 Spettrometria di massa (MALDI-TOF) .....	35
4.4 Pirosequenziamento.....	36
4.5 Real-Time PCR .....	37
4.6 Next Generation Sequencing.....	39
4.7 Raccolta dei dati e analisi .....	41
5. Risultati.....	42
6. Discussione.....	52
7. Conclusioni.....	54

## 1. Introduzione

L'implementazione delle tecnologie di analisi molecolare ha trasformato radicalmente l'approccio alla diagnosi dei tumori e alla gestione dei pazienti oncologici, offrendo una precisione e una specificità senza precedenti.<sup>1</sup> Le tecnologie molecolari consentono infatti l'identificazione di alterazioni genetiche specifiche associate ai tumori, migliorando così l'accuratezza e la tempestività della diagnosi rispetto ai metodi tradizionali.<sup>2</sup> Inoltre, l'analisi dei biomarcatori molecolari permette di rilevare la presenza di cellule tumorali anche in stadi iniziali e in quantità molto ridotte, aumentando significativamente la possibilità di un trattamento precoce e mirato.<sup>3</sup> Infine, la comprensione delle specifiche mutazioni genetiche presenti in un tumore consente di selezionare trattamenti mirati, che agiscono direttamente sulle alterazioni molecolari.<sup>4</sup> Questo approccio, conosciuto come terapia a bersaglio molecolare o medicina di precisione, migliora l'efficacia del trattamento riducendo al contempo gli effetti collaterali, grazie alla sua capacità di colpire selettivamente le cellule tumorali.<sup>5</sup> Per questi motivi le tecniche molecolari svolgono un ruolo cruciale nella ricerca oncologica, facilitando l'identificazione di nuovi target terapeutici e lo sviluppo di farmaci innovativi. Queste metodologie permettono anche di monitorare con maggiore precisione la risposta ai nuovi trattamenti, soprattutto nell'ambito degli studi clinici, accelerando così i progressi nel campo della terapia personalizzata.<sup>6</sup>

## 2. Principali marcatori molecolari oncologici

### 2.1 Tumore del polmone non a piccole cellule

Il tumore al polmone non a piccole cellule (NSCLC, dall'inglese Non-Small Cell Lung Cancer) rappresenta circa l'85% di tutti i casi di cancro polmonare, distinguendosi per la sua eterogeneità biologica e clinica. A differenza del carcinoma polmonare a piccole cellule (SCLC), che tende a essere più aggressivo e a diffondersi rapidamente, il NSCLC si sviluppa e si diffonde più lentamente. Questo tipo di tumore include vari sottotipi istologici, tra cui l'adenocarcinoma, il carcinoma a cellule squamose e il carcinoma a grandi cellule.<sup>7</sup>

Nel 2020 in Italia sono stati stimati circa 41.000 nuovi casi di tumore del polmone (27.550 negli uomini e 13.300 nelle donne): è la seconda neoplasia più frequente negli uomini (14%) e la terza nelle donne (7%). La possibilità di sviluppare un tumore del polmone nell'arco della vita è pari a 1:10 negli uomini e 1:35 nelle donne.<sup>8</sup>

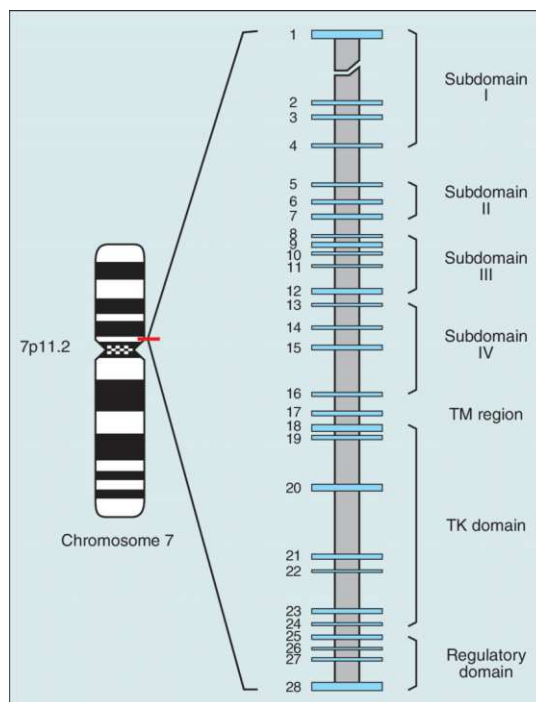
Il fumo di sigaretta è il principale fattore di rischio per lo sviluppo del tumore al polmone, responsabile dell'85%-90% dei casi nel nostro Paese. Il rischio relativo di sviluppare questo tipo di tumore è strettamente legato a vari fattori, tra cui il numero di sigarette fumate al giorno, la durata dell'abitudine al fumo (in anni) e il contenuto di catrame delle sigarette.<sup>9</sup>

La caratterizzazione molecolare dei tumori del polmone è un elemento fondamentale nel percorso di diagnosi e cura del paziente, poiché consente di raccomandare trattamenti mirati a popolazioni selezionate in base alla presenza o all'espressione di specifici marcatori.<sup>10</sup>

In tutti i pazienti con NSCLC in stadio avanzato (IIIB-IIIC non candidati a trattamenti loco-regionali e stadio IV), è raccomandato completare la diagnosi morfologica con la caratterizzazione delle mutazioni nei geni *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor) e *BRAF* (B-Raf proto-oncogene), la determinazione delle traslocazioni che coinvolgono *ALK* (Anaplastic Lymphoma Kinase), *ROS-1* (Proto-oncogene Tyrosine-Protein Kinase ROS) e *NTRK* 1, 2 e 3 (Neurotrophic

Tyrosine Receptor Kinase), e la valutazione immunohistochemica dei livelli di espressione del *PD-L1* (Programmed Death-Ligand 1), seguendo i cut-off validati dagli studi clinici registrati.<sup>11 12</sup>

Nel NSCLC, in particolare nel 10-15% degli adenocarcinomi nei pazienti caucasici, sono state identificate mutazioni attivanti negli esoni 18, 19, 20 e 21 di *EGFR*. Queste mutazioni, che differiscono per tipo e capacità di predire la risposta alle terapie, sono associate a una sensibilità variabile agli inibitori tirosin-chinasici di *EGFR* di prima (gefitinib, erlotinib), seconda (afatinib, dacomitinib) e terza generazione (osimertinib).<sup>13</sup> Le inserzioni nell'esone 20 di *EGFR* sono un gruppo eterogeneo di alterazioni molecolari che, in generale, predicono una bassa risposta a tutti gli inibitori tirosin-chinasici di *EGFR* attualmente approvati nella pratica clinica.<sup>14</sup>



**Figura 1** Le 85 mutazioni somatiche riscontrate nelle cellule tumorali a carico dell'oncogene di *EGFR*.

Riarrangiamenti dell'oncogene *ALK* con *EML-4* o altri partner di fusione sul braccio corto del cromosoma 2 generano una proteina specifica con attività tirosin-chinasica, coinvolta nei processi di sopravvivenza e proliferazione cellulare. Questi riarrangiamenti cromosomici, che interessano il dominio tirosin-chinasico del gene *ALK*, sono presenti in circa il 3-7% degli adenocarcinomi

polmonari (ADC) e identificano un sottogruppo di pazienti candidabili al trattamento con inibitori tirosin-chinasici di *ALK* di prima (crizotinib), seconda (alectinib, ceritinib, brigatinib) e nuova generazione (lorlatinib).<sup>15</sup>

Riarrangiamenti cromosomici del gene *ROS1* sono stati descritti in circa l'1 – 2% degli ADC polmonari e identificano un sottogruppo di pazienti candidabili a trattamento con inibitori tirosino-chinasici di *ROS1* di prima (crizotinib) e seconda (entrectinib) generazione.<sup>16</sup>

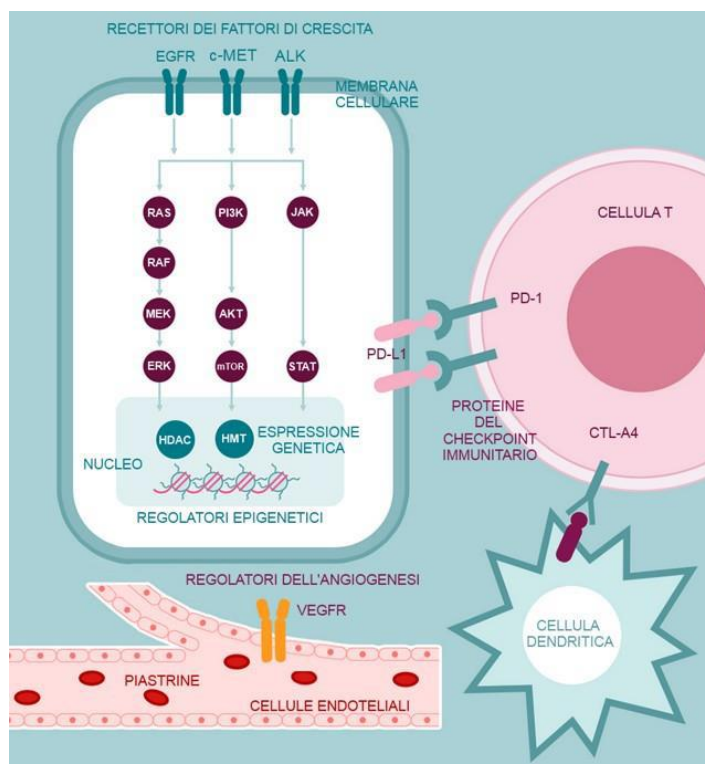
Le mutazioni puntiformi V600 nell'esone 15 del gene *BRAF*, tra cui la più comune c.1799T>A, responsabile della sostituzione amminoacidica p.V600E, sono state recentemente approvate come biomarcatori predittivi positivi di risposta al trattamento con la combinazione di due inibitori tirosin-chinasici, dabrafenib e trametinib. Per questo motivo, è raccomandata la valutazione dello stato mutazionale dell'esone 15 del gene *BRAF* con tecniche in grado di rilevare le mutazioni V600; si stima che tali alterazioni siano presenti nel 3-4% dei pazienti con adenocarcinoma (ADC).<sup>17</sup>

Recentemente, sono stati identificati riarrangiamenti cromosomici dei geni *NTRK* 1, 2 e 3 in circa lo 0,5-1% degli adenocarcinomi polmonari. Sebbene si tratti di un'alterazione rara, è fondamentale includerla nei test insieme alle altre alterazioni molecolari, poiché rappresenta un importante fattore predittivo di risposta a specifici inibitori tirosin-chinasici, attualmente disponibili nella pratica clinica, come l'entrectinib.<sup>18</sup>

Infine, tra i biomarcatori predittivi riconosciuti per pazienti con NSCLC avanzato, la valutazione dell'espressione immunoistochimica di *PD-L1* si è rivelata fondamentale per la selezione dei soggetti idonei al trattamento immunoterapico di prima linea con pembrolizumab.<sup>19</sup>

Per la valutazione dei biomarcatori molecolari approvati per la pratica clinica nei pazienti con NSCLC in stadio avanzato, è consigliabile utilizzare il sequenziamento genico di nuova generazione (NGS) rispetto alle tecnologie tradizionali. Questo approccio è preferibile poiché consente di ottimizzare l'uso del materiale limitato disponibile per i test di patologia molecolare predittiva e di

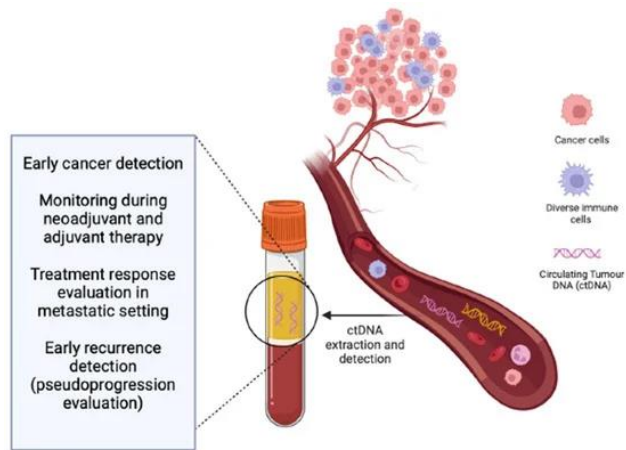
analizzare simultaneamente le alterazioni genetiche in *EGFR* e *BRAF*, così come le traslocazioni in *ALK*, *ROS1* e *NTRK*.<sup>20</sup>



*Figura 2* Target molecolari di maggiore rilevanza per la terapia del NSCLC.

Negli ultimi anni, è stato approvato nella pratica clinica anche il sequenziamento NGS di *cell-free* DNA (cfDNA) da biopsia liquida per le lesioni NSCLC.

Quest'ultimo permette l'analisi molecolare del tumore attraverso una procedura meno invasiva, rispetto alla tradizionale biopsia tissutale, e facilmente ripetibile; fondamentale per il monitoraggio della risposta terapeutica, della progressione e metastatizzazione della lesione. Tali analisi è applicabile sia a NSCLC avanzato che in stadio precoce.<sup>21</sup>



**Figura 3** Potenziale utilità clinica del ctDNA. (Fonte: <https://doi.org/10.3390/cancers16061197>)

## 2.2 Tumore al colon retto

Il tumore del colon-retto è una neoplasia che si sviluppa in tutte le porzioni dell'intestino crasso. È uno dei tumori più comuni a livello mondiale, ma può essere prevenuto o trattato con successo se diagnosticato precocemente. In Italia i tumori del colon-retto sono in assoluto i più frequenti (13% dei nuovi tumori diagnosticati all'anno in entrambi i sessi); in particolare, rappresentano la terza neoplasia più frequente negli uomini (dopo i tumori della prostata e del polmone) e la seconda nelle donne (dopo il tumore della mammella). Complessivamente i tumori del colon-retto rappresentano la seconda causa di morte per neoplasia in entrambi i sessi (11% del totale dei decessi per tumore registrati in Italia nel decennio 2003-2014, pari a circa 19.000 eventi).<sup>22</sup>

Due terzi dei tumori del colon-retto, in assenza di condizioni di familiarità o ereditarietà, sono considerati "sporadici". Per le neoplasie rettali, si riconoscono diversi fattori di rischio, tra cui ambientali, comportamentali (come il fumo, la scarsa attività fisica, l'alto BMI e l'obesità), dietetici (come il consumo elevato di carni rosse e alcol e/o il basso consumo di frutta e verdura) e la presenza di altre patologie predisponenti (come il diabete e la sindrome metabolica), che sono comuni anche ai fattori di rischio per i tumori del colon. Inoltre, circa 1 paziente su 20 con cancro colo-rettale (CCR) ha una sindrome di predisposizione ereditaria al CCR (SPE-CCR).<sup>23</sup>

La conferma istologica nelle neoformazioni del retto è indicata prima dell'intervento chirurgico o dell'inizio dell'iter chemio-radioterapico; questa raccomandazione è volta alla diagnosi differenziale con patologie che di solito non richiederebbero invece intervento chirurgico. La biopsia permette di valutare l'istotipo tumorale.<sup>24</sup>

Il carcinoma del colon-retto è caratterizzato da alterazioni molecolari che coinvolgono numerosi oncogeni e geni oncosoppressori, i quali collaborano nella trasformazione neoplastica. Circa l'80% dei casi di cancro del colon-retto è di tipo sporadico, mentre il restante 20% è considerato familiare o associato a sindromi genetiche. Tra queste, la poliposi adenomatosa familiare è associata a mutazioni del gene APC (adenomatous polyposis coli), e il carcinoma del colon-retto

ereditario non-poliposico, sindrome di Lynch, è caratterizzato da mutazioni germinali nei geni di riparazione dei mismatch (MMR), in particolare *hMSH2*, *hMSH6*, *hMLH1* e *hPMS2*. Queste due sindromi genetiche rappresentano rispettivamente meno dell'1% e circa il 3% di tutti i casi di tumore del colon-retto.<sup>25</sup>

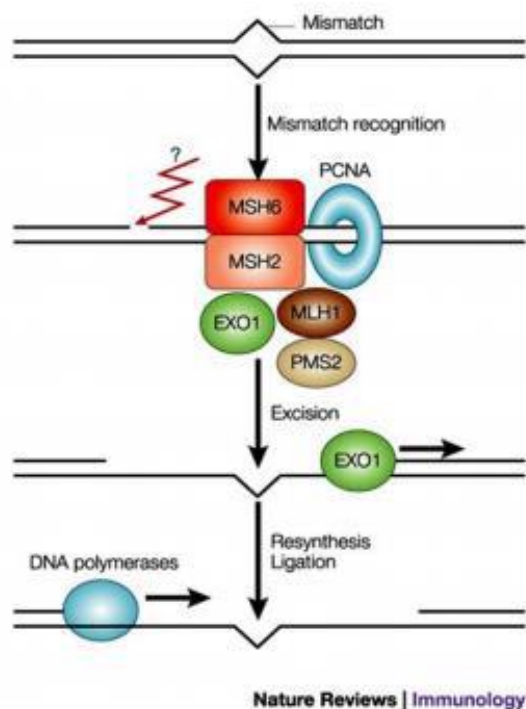
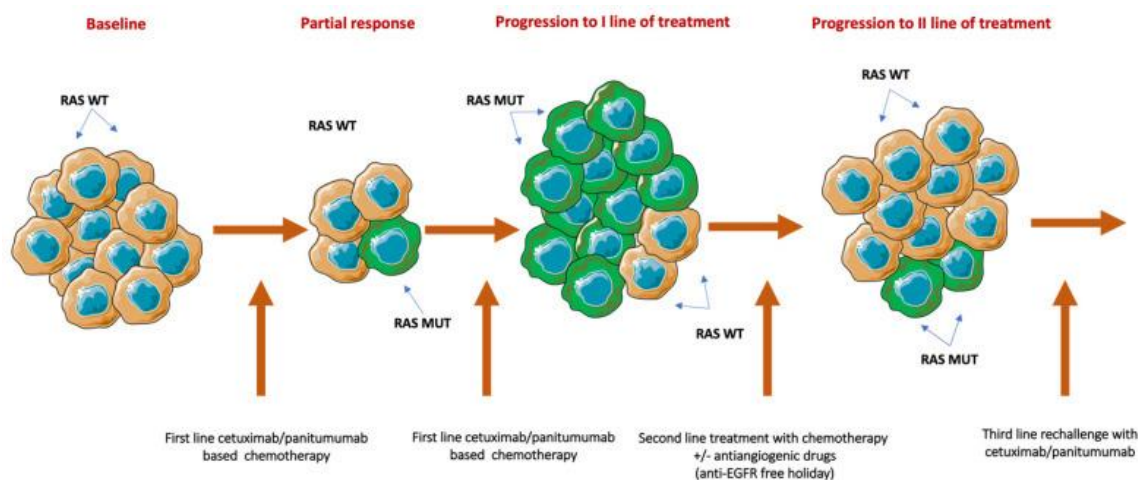


Figura 4 Sistema Mismatch Repair (MMR).

Alcune modificazioni genetiche hanno valore prognostico e/o predittivo, giocando un ruolo cruciale nella gestione clinica dei pazienti con carcinoma del colon-retto (CRC). In particolare, mutazioni del gene *KRAS* sono riscontrate in circa il 40% dei carcinomi del colon-retto. I dati riguardanti la correlazione tra mutazioni di *KRAS* e prognosi sono contraddittori: alcuni studi hanno suggerito un debole ruolo prognostico negativo della mutazione G12V, ma non ci sono evidenze conclusive a supporto di questa ipotesi. In circa il 15% dei casi con *KRAS* wild-type nell'esone 2, sono state identificate altre mutazioni meno frequenti di *KRAS* (esoni 3 e 4) e di *NRAS* (esoni 2, 3 e 4).<sup>26</sup>

Diversi studi clinici hanno dimostrato che le mutazioni di *KRAS* e *NRAS* sono predittive di resistenza ai farmaci anti-EGFR. In base a questi risultati, l'AIFA ha

limitato l'uso di Panitumumab e Cetuximab ai soli pazienti con *RAS* wild-type (cioè pazienti privi di mutazioni negli esoni 2, 3 e 4 di *KRAS* e *NRAS*).



**Figura 5** Il trattamento con inibitori di EGFR elimina rapidamente i cloni sensibili con *RAS* wild type (WT) e favorisce l'espansione delle cellule tumorali resistenti. (Fonte: 10.3390/cancers13081941)

L'analisi mutazionale dei geni *RAS* è attualmente indicata per i pazienti con carcinoma del colon-retto metastatico che sono candidati a un trattamento di prima linea o a linee successive con regimi terapeutici contenenti anticorpi monoclonali *anti-EGFR*. Questa analisi può essere effettuata con diverse metodiche e deve includere almeno i codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146 di entrambi i geni. Poiché esiste un'alta concordanza tra le mutazioni riscontrate nei tumori primitivi e nelle metastasi epatiche, la determinazione dello stato mutazionale di *RAS* può essere eseguita sia su tessuto tumorale primitivo che metastatico.<sup>27</sup>

Un tasso di discordanza del 25% circa è stato invece descritto tra tumore primitivo e metastasi linfonodali, che non dovrebbero pertanto essere utilizzate per la valutazione dello stato mutazionale di *RAS* se il tessuto del tumore primitivo è disponibile.<sup>28</sup>

Numerosi studi retrospettivi suggeriscono che alterazioni molecolari a carico di altri geni collegati alla via di trasduzione del segnale di *EGFR*, quali *BRAF*, *PIK3CA*, *PTEN*, potrebbero svolgere un ruolo nel determinare resistenza a farmaci *anti-EGFR*.<sup>29</sup>

Mutazioni di *BRAF* sono presenti in circa il 10% dei pazienti con carcinoma del colon retto e sono associate ad una prognosi sfavorevole della malattia.<sup>30</sup> Per

quanto riguarda i dati riferiti al solo carcinoma del retto, la mutazione di BRAF, stando a 3 casistiche retrospettive che hanno però arruolato al massimo 100 pazienti ciascuna, non supererebbe il 2% dei casi (in 2 delle 3 casistiche si è riscontrato lo 0% di mutazioni *BRAF*).<sup>31</sup>

Una recente pubblicazione del gruppo di MD Anderson ha esaminato il profilo molecolare di 1876 carcinomi coloretali, rivelando differenze nella distribuzione e nella tipologia delle mutazioni in base alla sede del tumore primitivo. In particolare, per i carcinomi rettali è stata osservata una bassa prevalenza di *MSI*, *CMS1*, *BRAFV600E*, *PTEN* e *PIK3CA* rispetto ai tumori del colon destro, con un aumento delle mutazioni *TP53* e della presenza del *CMS2*.<sup>32</sup>

### 2.3 Melanoma

Il melanoma è un tumore che colpisce la cute, è visibile all'esame obiettivo e può insorgere *de novo* oppure da un nevo benigno preesistente con modificazioni cliniche di forma o colore. I nevi appaiono come macchie scure e sono agglomerati di melanociti, che producono e accumulano melanina.<sup>33</sup>

Circa l'85% dei melanomi cutanei interessa le popolazioni di Nord America, Europa e Oceania con un'incidenza maggiore nella razza caucasica.<sup>34</sup> Si tratta di uno dei principali tumori che insorge in giovane età; in termini d'incidenza, nella popolazione italiana costituisce il secondo tumore più frequente nei maschi sotto i 50 anni e il terzo più frequente nelle femmine sotto i 50 anni. In Italia, nel 2022 sono state stimate circa 12.700 nuove diagnosi di melanoma della cute (maschi=7000; femmine=5700).<sup>35</sup>

I principali fattori di rischio per il melanoma includono: il numero di nevi comuni e atipici, le caratteristiche fenotipiche del soggetto, la storia familiare o personale del melanoma e/o carcinomi e lesioni precancerose e il pattern di esposizione alle radiazioni ultraviolette.<sup>36</sup>

Il primo esame per accertare il melanoma su neo sospetto, è la biopsia escissionale in quanto fornisce importanti informazioni sulla modalità di crescita orizzontale o verticale della proliferazione, sul grado di proliferazione delle cellule, sullo spessore di infiltrazione, sulla presenza di ulcerazione o regressione.<sup>37 38</sup>

Il melanoma cutaneo presenta un'alta prevalenza di mutazioni somatiche, sia nelle lesioni primarie che nelle lesioni metastatiche in cui sono anche più numerose, con un tasso medio di mutazioni stimato superiore a 20 mutazioni per megabase.<sup>39</sup> Tra il 70-80% di queste varianti sono rappresentate da sostituzioni C>T, che risultano essere strettamente dipendenti da un effetto mutageno dei raggi ultravioletti.<sup>40</sup> Negli ultimi anni sono state identificate specifiche mutazioni in geni che codificano per chinasi coinvolte nella via di segnalazione *RAS/RAF/MEK/ERK (Mitogen Activated Protein Kinases, MAPK)*, che regola i processi di proliferazione, differenziazione e sopravvivenza cellulare. Le analisi NGS hanno chiaramente indicato che le mutazioni nei geni *BRAF*, *NRAS* e *c-KIT*

sono generalmente mutualmente esclusive (meno del 3% dei casi presenta coesistenza di mutazioni in *BRAF* e *NRAS*), confermando i dati precedenti ottenuti con le analisi mutazionali convenzionali. <sup>41</sup>

Nel melanoma in stadio III o in stadio IV, il gene *BRAF* è mutato nel 45-50% dei casi; la mutazione più diffusa (85-90% dei casi) è rappresentata dalla sostituzione di una valina con acido glutammico al codone 600 (V600E). Le rimanenti mutazioni *BRAF* si verificano spesso nello stesso codone: V600K (la più frequente; <10% dei casi), V600D e V600R; le mutazioni in codoni diversi da V600 non sono comuni. <sup>42</sup>

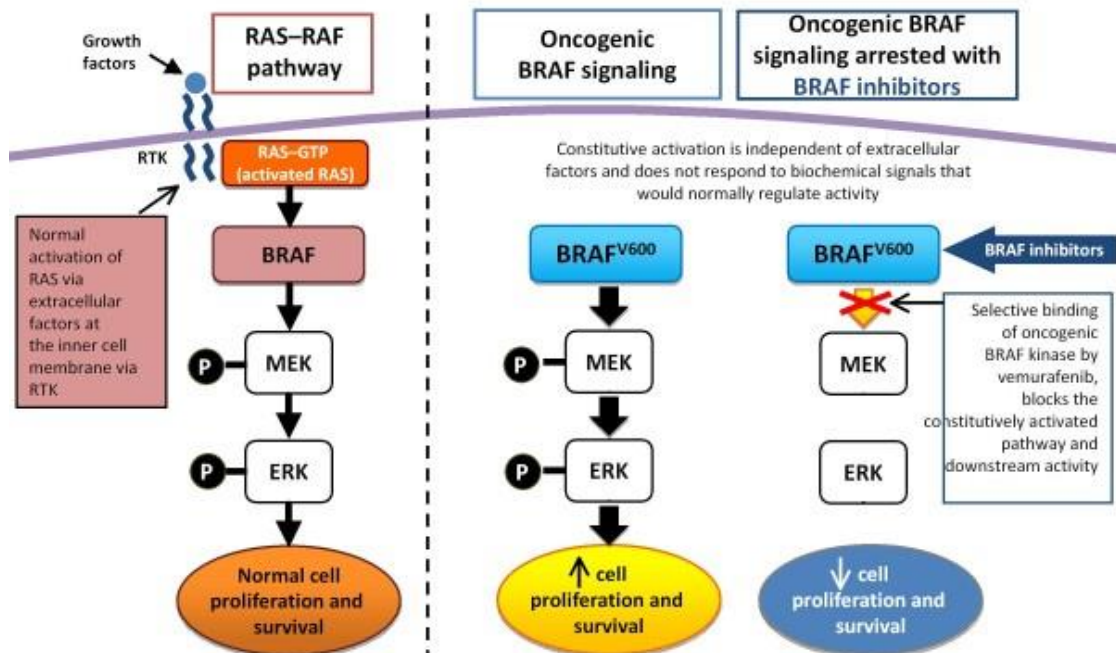


Figura 6 Via di segnalazione oncogenica di BRAF. (Fonte: 10.1186/1479-5876-10-85)

L'attivazione oncogenica costitutiva di *BRAF* promuove una proliferazione cellulare continua e incontrollata. Il fatto che *BRAF* sia mutato nella maggioranza (>50%) dei nevi non neoplastici suggerisce che la sua attivazione oncogenica è una condizione necessaria ma non sufficiente per lo sviluppo del melanoma,

essendo considerata un evento di iniziazione nella trasformazione neoplastica dei melanociti.<sup>43</sup>

La mutazione *BRAF* V600 ha oggi un significato prevalentemente predittivo nella gestione del paziente con melanoma, in quanto identifica una potenziale sensibilità al trattamento combinato di *BRAF* e *MEK* inibitori. Nei pazienti con melanoma avanzato (stadio IV o III inoperabile) oppure con melanoma in stadio III radicalmente operati e con mutazione *BRAF* V600 può essere presa in considerazione la terapia con *BRAF* e *MEK* inibitori.<sup>44 45</sup>

Le mutazioni *NRAS*, in pazienti con melanoma al III stadio o al IV stadio sono pressoché mutualmente esclusive con quelle *BRAF* (<3% casi con coesistenza di mutazioni in *BRAF* e *NRAS*); esse sono state identificate nel 20-28% dei pazienti affetti da melanoma e quelle più frequentemente riscontrate sono nel codone 61 (Q61K/L/R/H) e, in minor prevalenza, nei codoni 12 (G12C/R/S/A/D/V) e 13 (G13D)<sup>46</sup>. Le mutazioni di *NRAS* sono principalmente associate al sottotipo nodulare e a localizzazioni legate ad esposizione solare.<sup>47</sup>

Considerando la frequenza della mutazione di *c-KIT* nei vari sottotipi di melanoma (1-3% dei melanomi totali; 20% nei melanomi mucosali, 15% nei melanomi acrali, 3% nei melanomi su cute cronicamente fotoesposta e quasi assente nei melanomi su aree cutanee senza danno solare cronico), la valutazione dello stato mutazionale di *c-KIT* è raccomandata nei melanomi acrali e mucosali.<sup>48</sup> Le mutazioni di *c-KIT* sono prevalentemente sostituzioni missense e ampiamente distribuite nel gene; tuttavia ≥70% sono localizzate nell'esone 11 (mutazione L576P) e nell'esone 13 (mutazione K642E)<sup>49</sup>. Entrambe le mutazioni determinano attivazione costitutiva dei pathway MAPK e *PI3K/AKT*. Le mutazioni di *c-KIT* possono essere ricercate in tutti i casi in cui *BRAF* e *NRAS* sono wild-type ovvero contestualmente con una metodica multiplex in grado di valutare insieme lo stato di *BRAF*, *NRAS* e *c-KIT*.<sup>50</sup>

Le alterazioni dei geni *NTRK* si trovano in percentuale variabile nei tumori rari dell'adulto e dell'infanzia: in <5% dei melanomi, con particolare riferimento a quelli spitzoidi. Ciascuna famiglia di geni *NTRK* codifica per una distinta proteina *TRK*: *TRKA*, *TRKB* o *TRKC*. Svolgendo il proprio ruolo nella trasmissione di

segnali extracellulari al nucleo, i geni *NTRK* attivano vie di sopravvivenza (come le vie *MAPK/ERK* e *PI3K/AKT*), crescita e proliferazione cellulare. L'attivazione costitutiva dei geni *NTRK* guida l'oncogenesi e si verifica attraverso un meccanismo di fusione genica che provoca la sovraespressione della proteina di fusione TRK.<sup>51</sup> L'approccio NGS attualmente rappresenta il metodo più affidabile per testare fusioni, mutazioni puntiformi e splicing che coinvolgono i geni *NTRK1*, *NTRK2* e *NTRK3*. In alternativa, le varianti di fusione dei geni *NTRK1*, *NTRK2* e *NTRK3* possono essere rilevate mediante amplificazione genica tramite Real-Time PCR su RNA isolato da campioni di tessuto tumorale. L'identificazione dei tumori con questi riarrangiamenti genici è cruciale per selezionare i pazienti che possono beneficiare del trattamento con inibitori tirosin-chinasici, come entrectinib e larotrectinib. L'inibizione di *NTRK* ha dimostrato un'efficacia elevata, portando a risposte durature osservate indipendentemente dall'età del paziente, dal tipo di tumore o dal partner genico di fusione, bloccando l'azione delle proteine TRK che promuovono la crescita e diffusione tumorale.<sup>52</sup>

## 2.4 Tumore del pancreas esocrino

Il tumore del pancreas esocrino è una neoplasia che si origina nelle cellule esocrine del pancreas, responsabili della produzione di enzimi digestivi. È la forma più comune di tumore pancreatico, con l'adenocarcinoma duttale che costituisce la maggior parte dei casi.<sup>53</sup>

Uno studio ha rilevato che la presenza di neoplasia benigna nel pezzo operatorio dopo resezione chirurgica varia tra il 5% e il 13%, mentre una diagnosi istologica di cancro è stata riportata nel 5-9% dei pazienti sottoposti a intervento per pancreatite cronica.<sup>54</sup>

La diagnosi citologica o istologica può essere ottenuta mediante diverse metodiche equivalenti, a seconda delle indicazioni e dei protocolli locali. Per migliorare l'accuratezza diagnostica, è possibile utilizzare una combinazione di tecniche. Tuttavia, è importante notare che, sebbene la specificità della diagnosi preoperatoria (sia citologica che istologica) con queste metodiche sia molto elevata, la sensibilità è spesso bassa. Di conseguenza, in alcuni casi, la diagnosi di cancro può essere confermata solo tramite intervento chirurgico.<sup>55</sup>

Nei tumori del pancreas, la presenza di target molecolari è estremamente rara, ed è dimostrato sia significativamente maggiore nei tumori che non presentino mutazioni a carico del gene *KRAS*, che rappresentano circa il 10% dei casi. I geni più frequentemente mutati in questa popolazione sono *TP53* (44,5%) e *BRAF* (13,0%). Sono state anche identificate mutazioni multiple a carico di geni che codificano per proteine appartenenti a pathway del sistema di riparazione del DNA (*BRCA2*, *ATM*, *BAP1*, *RAD50*, *FANCE*, *PALB2*), del rimodellamento della cromatina (*ARID1A*, *PBRM1*, *ARID2*, *KMT2D*, *KMT2C*, *SMARCA4*, *SETD2*) e del ciclo cellulare (*CDKN2A*, *CCND1*, *CCNE1*).<sup>56</sup>

Inoltre, mentre nella coorte di pazienti con tumori *KRAS* mutanti (*KRAS* MT) sono state praticamente escluse le fusioni geniche, ad eccezione di un caso con fusione di *MET*, nel 21% dei pazienti con *KRAS* wild-type (*KRAS* WT) sono state identificate fusioni geniche, tra cui *BRAF* (6,6%), *FGFR2* (5,2%), *ALK* (2,6%), *RET* (1,3%) e *NRG1* (1,3%). Sono state inoltre rilevate amplificazioni di *FGF3* (3%), *ERBB2* (2,2%), *FGFR3* (1,8%), *NTRK* (1,8%) e *MET* (1,3%).<sup>57</sup>

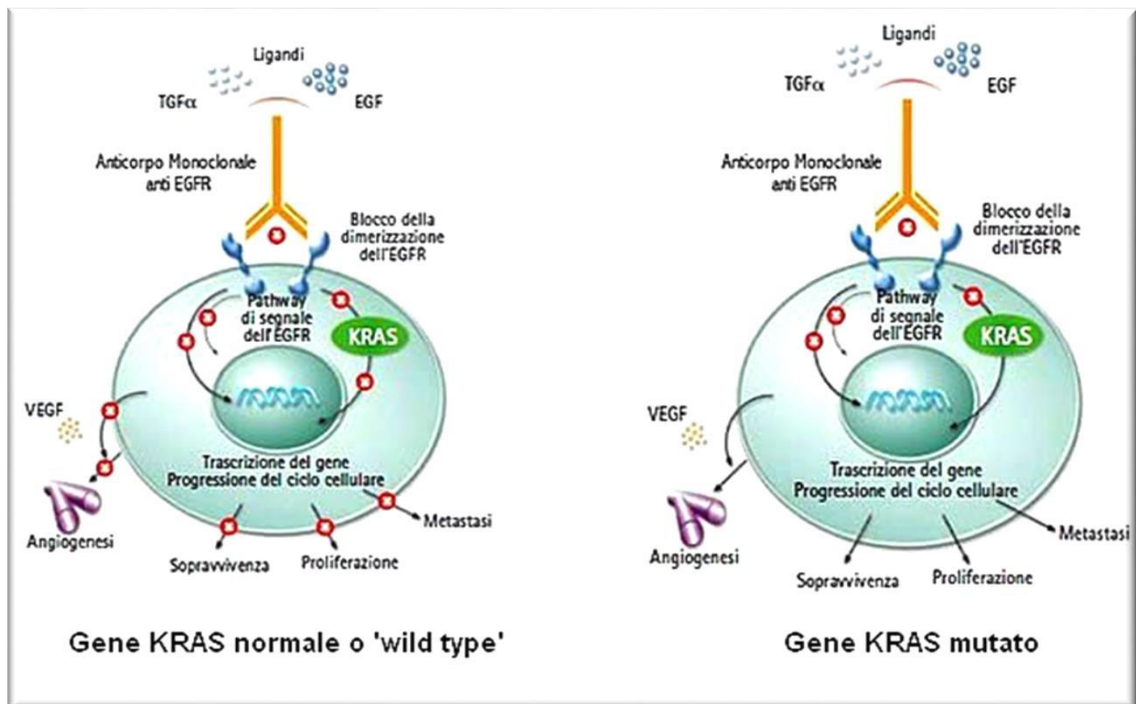


Figura 7 Confronto tra il gene RAS wild-type e il gene RAS mutato.

Attualmente, ci sono due farmaci che hanno ricevuto l'approvazione agnostica da parte di AIFA per tutti i tumori solidi non operabili o metastatici, privi di valide alternative terapeutiche e con fusioni di *NTRK*: larotrectinib ed entrectinib.<sup>58</sup>

Il farmaco Larotrectinib è un inibitore delle TRK (tropomyosin receptor kinase) che agisce specificamente contro le fusioni dei geni *NTRK* (neurotrophic tyrosine receptor kinase). Queste fusioni geniche portano alla produzione di proteine TRK anomale che promuovono la crescita e la proliferazione cellulare, contribuendo allo sviluppo e alla progressione di vari tumori, incluso il tumore del pancreas.<sup>59</sup>

L'Entrectinib è un inibitore selettivo delle TRK (tropomyosin receptor kinase) come il Larotrectinib ma agisce anche contro *ROS1* (c-ros oncogene 1) e *ALK* (anaplastic lymphoma kinase), progettato per trattare i tumori solidi che presentano fusioni geniche *NTRK*, *ROS1* o *ALK*.<sup>60</sup>

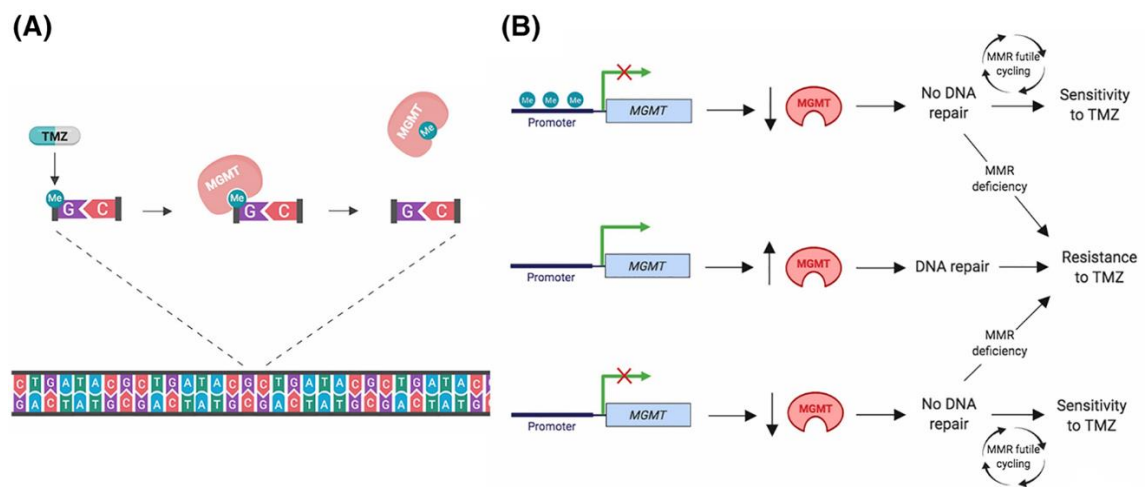
Data la prognosi sfavorevole dei pazienti con adenocarcinoma del pancreas, le opzioni terapeutiche limitate e la possibilità di identificare alterazioni potenzialmente trattabili (come *NTRK*, *BRAF*, *ALK*, *RET*), è auspicabile considerare l'inserimento in trial clinici che offrano un'analisi NGS estesa per i pazienti in buone condizioni cliniche dopo progressione alla terapia standard.

Se un'analisi NGS completa non è disponibile, sarebbe comunque utile valutare almeno lo stato di *NTRK*, considerando che esistono farmaci inibitori di *NTRK* approvati e rimborsati.<sup>61</sup>

## 2.5 Glioblastoma

Il glioblastoma di IV grado (GBM) è il tumore cerebrale maligno più aggressivo e comune tra gli adulti. Per individuarlo esistono due biomarcatori chiave, la metilazione del promotore del gene *MGMT* e le mutazioni dell'enzima *IDH*, giocano un ruolo cruciale nella patogenesi e nella risposta terapeutica del GBM.<sup>62</sup>

Il gene *MGMT* (O6-metilguanina-DNA-metiltransferasi) è coinvolto nella riparazione dei danni al DNA, in particolare della lesione O6-metilguanina, causata da agenti alchilanti. La metilazione del promotore di *MGMT* ne riduce l'espressione, limitando così la capacità della cellula di riparare il danno al DNA.<sup>63</sup> Nei pazienti con GBM, la metilazione di *MGMT* è associata a una migliore risposta alla chemioterapia con temozolomide (TMZ), poiché impedisce la riparazione del danno indotto dalla TMZ, portando alla morte cellulare tumorale perciò la metilazione di *MGMT* è considerata un fattore prognostico positivo nei pazienti con GBM.<sup>64</sup>



**Figura 8** Funzione di *MGMT* come responsabile della risposta a TMZ. (Fonte: 10.1016/j.trecan.2020.02.010)

Le mutazioni nel gene *IDH* (isocitrato deidrogenasi), in particolare le mutazioni di *IDH1* e *IDH2*, sono presenti in una sottopopolazione di GBM. Queste mutazioni sono associate a una prognosi migliore e a un miglioramento della sopravvivenza rispetto ai GBM che non presentano tali mutazioni, che vengono definiti *IDH* wild-type.<sup>65</sup> Le mutazioni di *IDH* portano a una produzione aberrante di 2-idrossiglutarato (2-HG), un oncometabolita che altera la metilazione del DNA e delle proteine, influenzando la regolazione epigenetica e favorendo la

tumorigenesi. Nei GBM di IV grado, tuttavia, le mutazioni di *IDH* sono rare e più comuni nei gliomi di grado inferiore .<sup>66</sup>

L'analisi combinata della metilazione di *MGMT* e dello stato mutazionale di *IDH* è importante nella gestione clinica del GBM, poiché fornisce informazioni utili per personalizzare il trattamento e prevedere l'esito terapeutico.<sup>67</sup>

## 2.6 Tumore della mammella

Il carcinoma della mammella è il tumore con la maggiore incidenza e mortalità correlata al cancro a livello globale tra le donne. Tuttavia, i recenti progressi scientifici e i miglioramenti nelle terapie farmacologiche hanno portato a un notevole aumento della sopravvivenza mediana per i pazienti affetti.<sup>68</sup>

L'algoritmo attuale per il trattamento del carcinoma mammario avanzato si basa su terapie sistemiche, scelte in base al sottotipo biologico della malattia, che possono essere integrate da interventi locoregionali mirati, a seconda delle sedi coinvolte e delle necessità cliniche.<sup>69</sup>

Così come nella malattia in fase precoce, anche nel carcinoma mammario avanzato i principali biomarcatori necessari per la definizione della strategia terapeutica sono i recettori ormonali per estrogeno (ER) e progesterone (PR), antigene KI-67 e il recettore *HER2*. Laddove possibile, in pazienti con recidiva o progressione di malattia, la biopsia di un sito metastatico andrebbe eseguita al fine di rivalutare il profilo biologico. Infatti, in caso di recidiva/progressione, lo status di recettori ormonali e/o di *HER2* può modificarsi in circa il 20% e 10% dei casi, rispettivamente.<sup>70</sup>

Nell'ultimo decennio, il numero di biomarcatori potenzialmente rilevanti ai fini terapeutici si è progressivamente arricchito. Al contempo, grazie all'implementazione del sequenziamento di nuova generazione (NGS), l'uso di pannelli multigenici è divenuto via via più frequente in pazienti con carcinoma mammario avanzato.<sup>71</sup>

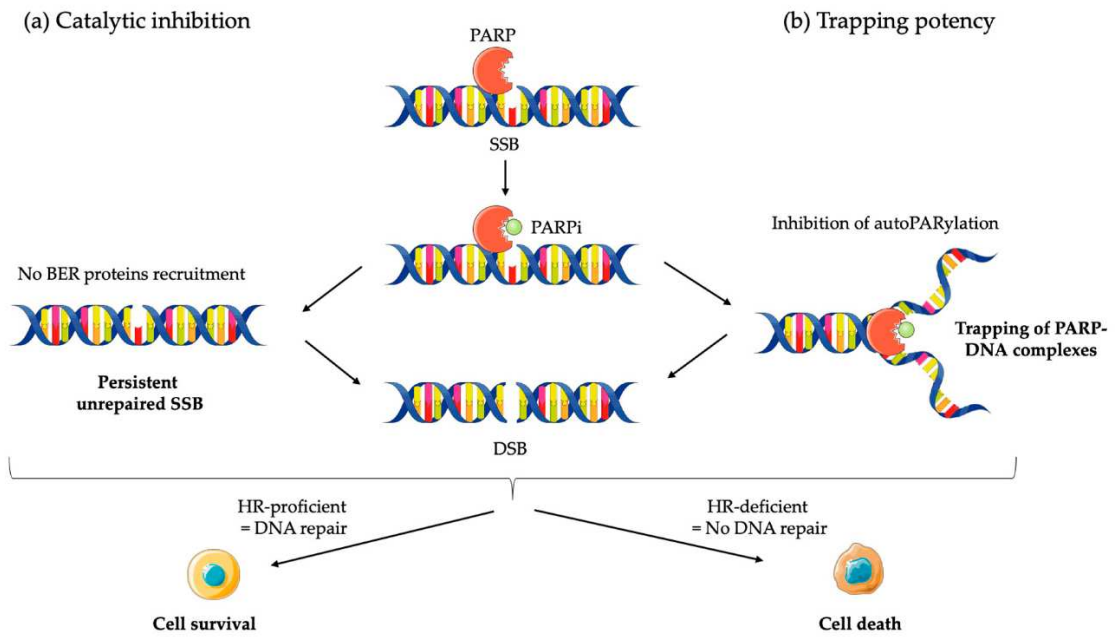
Le fosfatidilinositolo 3-chinasi (*PI3K*) sono chinasi lipidiche che svolgono un ruolo cruciale nella regolazione di diverse funzioni cellulari, tra cui il ciclo cellulare, l'apoptosi, la riparazione del DNA, la senescenza, l'angiogenesi, il metabolismo e la motilità. La loro attivazione avviene in risposta a segnali extracellulari come fattori di crescita, citochine/chemochine, ormoni e integrine. Una volta attivate, le *PI3K* agiscono come intermedi di segnalazione, attivando vie effettrici come il pathway Akt/mTOR. Strutturalmente, le *PI3K* sono composte da subunità catalitiche p110 associate a subunità regolatorie p85.<sup>72</sup>

Recentemente numerose mutazioni puntiformi sono state identificate nel gene codificante per la subunità catalitica p110 alfa della classe 1A PI3K (*PIK3CA*).<sup>73</sup>

È stato osservato che le mutazioni somatiche nel gene *PIK3CA* si verificano in circa il 30% di tumori di origine epiteliale, incluso il carcinoma mammario, infatti p110 è la proteina più mutata.<sup>74</sup> Inoltre, l'80% di queste mutazioni si verifica nei domini chinasi ed elicoidali di *PIK3CA* (nell'esone 20 e nell'esone 9, rispettivamente). I mutanti *PIK3CA* inducono la trasformazione oncogenica tramite l'attivazione costitutiva di p110alpha che porta ad un'ulteriore attivazione e stimolazione della via di segnalazione Akt/mTOR che controlla la proliferazione cellulare, la crescita, l'apoptosi e il metabolismo.<sup>75</sup> Le mutazioni di *PIK3CA* possono essere valutate tramite Real Time PCR su DNA tumorale circolante (biopsia liquida) o campione tissutale. In caso di risultato negativo su biopsia liquida, è possibile ripetere il test sul tessuto tumorale. Inoltre, lo status mutazionale di *PIK3CA* può essere valutato nel contesto di pannelli NGS multigenici.<sup>76</sup>

Le mutazioni nella subunità catalitica alfa della fosfatidil-inositolo 3-chinasi (PI3K) sono biomarcatori predittivi per la risposta all'inibitore  $\alpha$ -selettivo di PI3K, alpelisib, nei pazienti con carcinoma mammario HR+/HER2-.<sup>77</sup>

La valutazione dello stato mutazionale germinale di *BRCA1* e *BRCA2* (gBRCA1/2) nelle pazienti con carcinoma mammario avanzato HER2-negativo è raccomandata per determinare l'idoneità al trattamento con inibitori della poli-(ADP-ribosio)-polimerasi (PARP), indipendentemente dall'età o dalla storia familiare.



**Figura 9** I meccanismi d'azione degli inibitori di PARP. (Fonte: <https://doi.org/10.3390/cancers12061502>)

La presenza di una variante patogenetica germinale di *BRCA1/2* permette l'accesso al trattamento con olaparib o talazoparib nelle pazienti con tumore mammario triplo negativo e con talazoparib nelle pazienti con carcinoma HR+/HER2-negativo.<sup>78</sup>

## 2.7 Tumore dell'endometrio e dell'ovaio

In Italia, il carcinoma dell'endometrio rappresenta il terzo tumore per frequenza nelle donne nella fascia di età 50-69 anni complessivamente il 4.6 % di tutti quelli diagnosticati, con circa 8300 nuovi casi ogni anno.<sup>79</sup>

Sono stati, invece, riportati 313.959 nuovi casi di carcinoma ovarico e 207.252 morti nel mondo nel 2020. In Italia sono stati segnalati 5200 nuovi casi nello stesso anno. La possibilità di sviluppare questa neoplasia nell'arco della vita di una donna è di 1/82.<sup>80</sup>

Sono stati identificati diversi fattori di rischio per i tumori dell'endometrio, tra cui obesità, esposizione cronica a iperestrogenismo endogeno o esogeno, terapia con tamoxifene, cicli anovulatori, ipertensione e diabete mellito. Oltre a una predisposizione genetica specifica per il carcinoma endometriale, esiste anche una predisposizione familiare a sviluppare tumori maligni in vari organi, come nella sindrome di Lynch di tipo II, che include il carcinoma endometriale, mammario, colonico e ovarico.<sup>81</sup>

Per i tumori ovarici sierosi di alto grado si ipotizza che l'origine possa derivare da una lesione precancerosa (STIC) situata nella tuba. La fimbria tubarica è soggetta a stress ossidativo causato dal ferro derivante dalla lisi dei globuli rossi durante la mestruazione retrograda. I processi di ossidoriduzione del ferro ( $Fe^{3+} - Fe^{2+}$ ) generano specie reattive dell'ossigeno (ROS), che provocano perossidazione lipidica, rottura delle eliche del DNA, attivazione di oncogeni e inibizione di geni oncosoppressori.<sup>82</sup>

Il tumore della cervice può essere distinto a livello molecolare in due tipologie principali: il carcinoma endometriode di tipo I, che è estrogeno-dipendente, moderatamente differenziato istologicamente, frequentemente diagnosticato in stadi iniziali e associato a una prognosi più favorevole; e il carcinoma non endometriode di tipo II, non estrogeno-dipendente, come il carcinoma sieroso, che è scarsamente differenziato e presenta un'evoluzione clinica più rapida e sfavorevole.<sup>83</sup>

Le principali alterazioni molecolari del carcinoma del primo tipo sono *PTEN* (Phosphatase and Tensin homolog on chromosome)<sup>84</sup>, mutazioni dei geni *KRAS* e/o  $\beta$ -catenina e/o *PIK3* (Phosphatidylinositol 3-Kinase); mentre i carcinomi sierosi spesso presentano mutazioni del gene *p53*, inattivazione del gene *p16*, bassa espressione di E-caderina ed iperespressione di *HER-2*.<sup>85</sup>

Il carcinoma dell'ovaio può essere distinto in base alle caratteristiche morfologiche, immunoistochimiche e molecolari in 5 gruppi principali: il carcinoma sieroso di alto grado (70% dei casi), il carcinoma endometrioidale (10%), il carcinoma a cellule chiare (10%), il carcinoma mucinoso (3%) ed il carcinoma sieroso di basso grado (<5%).<sup>86</sup>

Quelli che presentano una variazione molecolare significativa sono: il carcinoma sieroso di basso grado che presenta mutazioni dei geni *BRAF* e *KRAS* per i 2/3 dei casi,<sup>87</sup> il tumore mucinoso borderline interessa mutazioni di *KRAS* per il 78,8% e il carcinoma mucinoso per il 43,6%.<sup>88</sup>

Le pazienti con *BRCA* mutato con carcinoma ovarico hanno una prognosi migliore.<sup>89</sup> Il test *BRCA* può essere eseguito sia sul sangue periferico sia sul tessuto tumorale, evidenziando in questo caso sia le varianti ereditarie sia le varianti acquisite per mutazione somatica. In presenza di un test positivo sul tumore va sempre eseguito il test genetico su un campione di sangue per distinguere le mutazioni germline, che rendono necessario il counselling e il test genetico nei familiari, da quelle somatiche.<sup>90</sup>

Il deficit di ricombinazione omologa HR (HRD) è stato osservato non soltanto nelle pazienti con carcinoma ovarico con mutazioni germline o somatica di *BRCA1* o *BRCA2*, ma anche in quelle con silenziamento epigenetico di *BRCA1*, o perdita di funzione di altri geni, quali *RAD51*, ataxia telangiectasia mutated protein (*ATM*), ataxia telangiectasia mutated, *RAD3* related-protein (*ATR*), *PALB2*, geni del Fanconi Anemia Complementation Group [*FANC*], *EMSY*, *BARD*, *BRIP*, ect).<sup>91</sup> Queste pazienti presentano un fenotipo "BRCAness" simile a quello delle pazienti con mutazioni germinali di *BRCA1* o *BRCA2*, caratterizzato da istologia sierosa, elevate percentuali di risposta alla terapia con platino, sia

alla prima linea che alle linee successive, lunghi intervalli tra le recidive e una migliore sopravvivenza complessiva. La presenza di questo profilo *BRCAness* identifica un sottogruppo di pazienti con carcinoma ovarico a prognosi più favorevole e una eccellente risposta ai trattamenti con platino e inibitori delle *PARP*.<sup>92</sup>

Nel 2013, lo studio del Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA) pubblicato su Nature ha rivoluzionato la classificazione del carcinoma endometriale analizzando il profilo genomico di 373 campioni (307 endometrioidi, 53 sierosi e 13 misti endometrioidi-sierosi). Questo lavoro ha introdotto una classificazione più dettagliata basata su caratteristiche molecolari, superando la tradizionale divisione dualistica.<sup>93</sup>

La classificazione molecolare individua 4 sottogruppi: *POLE* ultramutated caratterizzati da un'alta mutagenicità dovuta a mutazioni nel dominio esonucleasico della DNA polimerasi  $\epsilon$  (*POLE*), poche alterazioni del numero di copie geniche, frequenti mutazioni in geni come *PTEN*, *PIK3R1*, *PIK3CA*, *FBXW7* e *KRAS*, e un'eccellente prognosi, infatti le mutazioni *POLE* sembrano essere un biomarcatore predittivo per una buona risposta terapeutica e una prognosi eccellente, anche in pazienti con tumori di alto grado istologico. Pertanto, il test molecolare per identificare queste mutazioni può essere uno strumento importante per guidare le decisioni cliniche.<sup>94</sup> Il secondo sottogruppo è *MSI hypermutated* definito dall'instabilità dei microsatelliti causata dalla metilazione del promotore di *MLH1* e da una mutagenicità elevata. Presenta poche alterazioni nel numero di copie e mutazioni ricorrenti di *KRAS* e *PTEN*. Il copy-number low è il terzo sottogruppo, di cui fanno parte prevalentemente tumori endometrioidi di grado 1-2, con stabilità dei microsatelliti, bassa mutagenicità e frequenti mutazioni del gene *CTNNB1*.<sup>95</sup> Infine il sottogruppo Copy-number high (serous-like) che presenta numerose alterazioni del numero di copie geniche, bassa mutagenicità, e frequenti mutazioni di *TP53*, *FBXW7* e *PPP2R1A*, con una prognosi sfavorevole.<sup>96</sup>

## 2.8 Tumore della prostata

In Italia, il carcinoma della prostata è attualmente la neoplasia più comune tra gli uomini, rappresentando oltre il 20% di tutti i tumori diagnosticati a partire dai 50 anni. Sebbene il carcinoma prostatico sia il tumore più frequente per incidenza, occupa il terzo posto per mortalità, colpendo principalmente uomini oltre i 70 anni. Tuttavia, si osserva una costante e moderata diminuzione della mortalità associata a questa malattia.<sup>97</sup>

La sopravvivenza dei pazienti con carcinoma prostatico, esclusa la mortalità per altre cause, è attualmente del 92% a 5 anni dalla diagnosi, e mostra una crescita costante e significativa. Questo miglioramento è principalmente attribuibile alla diagnosi precoce e alla crescente diffusione dello screening opportunistico tramite il dosaggio del PSA, che ha portato a una riduzione dell'incidenza dei tumori in stadio avanzato al momento della diagnosi.<sup>98</sup>

Il principale fattore di rischio per il carcinoma prostatico è l'età, poiché l'incidenza del tumore aumenta con l'avanzare dell'età. Il secondo fattore di rischio significativo è la razza: i più elevati livelli circolanti di androgeni, DHT e 5-alfa reduttasi indicano che gli individui di origine africana sono a maggiore rischio. Anche elevati livelli di testosterone e IGF-1 sono associati a un rischio maggiore di sviluppare il tumore. La storia familiare di tumore alla prostata e i fattori genetici rappresentano rischi ulteriori, seguiti dallo stile di vita, inclusi la dieta e il fumo.<sup>99</sup>

È stato osservato che circa il 10% dei pazienti con carcinoma prostatico che hanno sviluppato almeno un'altra neoplasia sono portatori di mutazioni germinali associate a un aumentato rischio oncologico.<sup>100</sup> Alla luce di queste evidenze appare ragionevole approfondire a livello anamnestico la presenza di neoplasie nello stesso paziente e/o nei suoi familiari per evidenziare eventuali sindromi ereditarie che comportano un elevato rischio di cancro e per suggerire un'eventuale consulenza genetica. Globalmente circa il 12% dei pazienti affetti da carcinoma prostatico in fase metastatica è portatore di mutazioni germinali a carico di almeno uno dei 16 geni coinvolti nel riparo del DNA, più frequentemente gene *BRCA2*.<sup>101</sup> Le mutazioni germinali a carico di *BRCA2*, e in minor misura, di *BRCA1* implicano un aumentato rischio di sviluppare il cancro della prostata.<sup>102</sup>

Altre mutazioni a carico di geni coinvolti nel riparo del DNA come *ATM*, *PALB2* e *CHEK2*, rappresentano pure un fattore di maggiore suscettibilità a sviluppare un cancro prostatico.<sup>103</sup> Inoltre le neoplasie prostatiche degli individui portatori di mutazioni a carico dei geni *BRCA1* e *2* si sviluppano più precocemente e tendono ad avere un comportamento più aggressivo che è causa di una ridotta speranza di vita.<sup>104</sup>

Nei pazienti con malattia metastatica, la palliazione rimane l'obiettivo più concretamente perseguibile, soprattutto nei pazienti sintomatici. Per questi pazienti esistono attualmente varie opzioni di terapia ormonale e chemioterapia (e, in prospettiva, con farmaci di più recente sviluppo come gli inibitori di *PARP* e gli inibitori di immuno-check point) che, unitamente alle più recenti forme di terapia radio metabolica e alle terapie bone-targeted, possono ugualmente impattare significativamente sia sulla qualità che sulla speranza di vita.<sup>105</sup>

Un recente studio su una vasta coorte di pazienti trattati con inibitori del segnale del recettore androgenico di nuova generazione (ARSI) ha messo in luce il significato prognostico negativo delle alterazioni del gene *RB1*. Inoltre, lo studio ha mostrato che le mutazioni dei geni *BRCA1* e *BRCA2* non avevano alcun valore predittivo per la risposta a questi farmaci rispetto ai pazienti privi di tali mutazioni.<sup>106</sup>

Il carcinoma della prostata è frequentemente associato a mutazioni somatiche. Mutazioni somatiche dei geni coinvolti nella riparazione del DNA sono state riscontrate nel 19% dei tumori prostatici localizzati e nel 23% dei tumori metastatici in fase di resistenza alla castrazione. La maggior parte di queste mutazioni riguarda i geni *BRCA2* e *ATM*.<sup>107</sup>

Alcune linee guida, come ad esempio le linee guida NCCN americane, raccomandano uno screening genetico mediante tecniche di sequenziamento (next generation sequencing: NGS) a livello germinale includente un pannello di geni comprendente *BRCA2*, *BRCA1*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*, specialmente nei pazienti con storia familiare positiva, in quelli a rischio alto e molto alto.<sup>108</sup>

Il *PCA3* (noto anche come DD3) è un gene localizzato sul cromosoma 9q21–2245. Il mRNA codificante del *PCA3* risulta iperespresso nel 95% dei tumori prostatici, mentre un basso livello di espressione è stato descritto nel tessuto prostatico normale e nell'ipertrofia prostatica benigna.<sup>109</sup> Tre meta-analisi hanno recentemente esaminato il ruolo del *PCA3* e confermano che il marcatore ha una accettabile accuratezza diagnostica e può essere di aiuto per orientare verso la prima biopsia riducendo il numero di biopsie non necessarie.<sup>110</sup>

Fenomeni di riarrangiamento genico sono stati descritti in numerose neoplasie, compreso il carcinoma della prostata. Le alterazioni più comunemente identificate nel genoma del carcinoma prostatico sono fusioni di promotori androgeno-regolati con il gene *ERG* (*ETSrelated gene*) o altri membri della famiglia di fattori di trascrizione *ETS* (*E26 transformation-specific*).<sup>111</sup> Fra queste, l'alterazione più frequentemente identificata nel carcinoma della prostata è il *TMPRSS2:ERG*, fusione fra *ERG* e il gene *TMPRSS2*, che codifica per una proteasi transmembrana (serina 2) 541. Il riarrangiamento *TMPRSS2-ERG* può essere misurato nelle urine dopo massaggio prostatico e viene espresso in rapporto al mRNA del PSA nel campione usato come criterio di normalizzazione.<sup>112</sup>

### 3. Scopo dello studio

In passato, il gold standard per la diagnosi anatomopatologica delle neoplasie è stato lo studio morfologico cellulare attraverso le metodiche citologiche, istologiche e ultrastrutturali combinate con esami fenotipici di riconoscimento della presenza di antigeni specifici per la diagnosi di istotipo; informazioni integrative con significato prognostico sono la stadiazione patologica, la presenza di invasioni linfovaskolari o perineurali, l'interessamento dei margini.

L'introduzione dell'analisi molecolare ha rivoluzionato la diagnosi e il trattamento oncologico, offrendo precisione e specificità senza precedenti. Le tecnologie molecolari consentono di identificare le alterazioni genetiche specifiche del tumore, fornendo le informazioni per una diagnosi più accurata e spesso più precoce rispetto ai metodi tradizionali.

Anche la classificazione dei tumori, non più solo morfologica ma supportata dall'analisi del profilo genetico, risulta più dettagliata e specifica. Conoscere le alterazioni genetiche di una lesione permette inoltre, una miglior valutazione delle potenziali risposte al trattamento e la scelta di trattamenti mirati, che agiscono in maniera specifica sulle cellule tumorali, aumentando l'efficacia e riducendo gli effetti collaterali.

Infine, lo studio molecolare del tumore fornisce informazioni fondamentali per la ricerca oncologica, aiutando ad identificare nuovi bersagli per lo sviluppo dei nuovi farmaci.

I marcatori tumorali possono essere anche isolati dal plasma, biopsia liquida. Quest'ultima rappresenta uno strumento rivoluzionario nella medicina di precisione con numerosi vantaggi rispetto alle biopsie tradizionali. Richiedendo una procedura minimamente invasiva e facilmente ripetibile, la biopsia liquida è considerata uno degli strumenti più validi ed innovativi per una miglior qualità della cura e della valutazione prognostica per i pazienti.

Lo scopo di questo elaborato è analizzare come è cambiata l'attività diagnostica per i pazienti oncologici attraverso lo studio delle implementazioni tecnologiche realizzate negli ultimi anni nella SOD di Anatomia Patologica dell'Azienda

Ospedaliero Universitaria delle Marche, al fine di fornire dati utili sia per la gestione economica e organizzativa dei laboratori e delle risorse umane e tecnologiche che per l'efficienza diagnostica dei test. Per questo scopo l'attività svolta è stata riesaminata attraverso la consultazione dell'Archivio informatico della SOD.

## 4. Materiali e metodi

In questa sezione vengono riportati i materiali esaminati e le metodiche di analisi dei casi analizzati nel laboratorio negli anni 2021, 2022 e 2023.

Il laboratorio è composto da un team di quattro tecnici di laboratorio responsabile delle operazioni manuali di estrazione e processazione del campione, utilizzando le tecniche appropriate per l'analisi. I patologi della struttura che selezionano il materiale d'interesse. Infine, un biologo si occupa di interpretare i risultati forniti dagli strumenti, validandoli e redigendo i referti, qualora ritenuti idonei.

### 4.1 Estrazione DNA e RNA da materiale FFPE

I patologi hanno selezionato le aree di interesse sui vetrini istologici, valutando la cellularità tumorale di almeno il 50% o aree contenenti almeno 100 cellule tumorali, da cui estrarre gli acidi nucleici.

DNA e RNA di campioni di tessuto tumorale, provenienti da biopsia o resezioni chirurgiche, fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFPE), sono stati isolati, in base alla quantità di campione disponibile, adottando due metodi di estrazione differenti. Per campioni di quantità limitata, è stata scelta l'estrazione manuale con il kit QIAamp DNA Mini kit (Quiagen), in quanto più adatta a preservare la maggior parte del materiale e garantire un recupero più accurato. Al contrario, campioni ricchi di materiale sono stati estratti tramite estrattore automatico (MagCore System) con kit specifico: kit MagCore Genomic DNA FFPE One-Step Kit for MagCore System (Diatech Pharmacogenetics s.r.l., Ancona, Italy), seguendo il manuale d'istruzione; che consente una maggiore efficienza e riproducibilità.

L'estrazione di RNA è stata effettuata utilizzando tamponi di lisi contenenti inibitori delle RNasi per evitare contaminazioni da DNA genomico. Ai tamponi di lisi sono state aggiunte DNasi prive di RNasi.

Una prima stima della concentrazione dei campioni è stata determinata mediante analisi spettrofotometrica con NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific Inc.). La misurazione è stata effettuata ad una lunghezza d'onda di 260 nm, poiché il DNA assorbe in modo ottimale a questa lunghezza. Il rapporto tra le letture a 260 nm e 280 nm è stato utilizzato per valutare la purezza del campione, con un rapporto compreso tra 1,8 e 2,0 indicativo di campioni di DNA puro ed il rapporto tra le

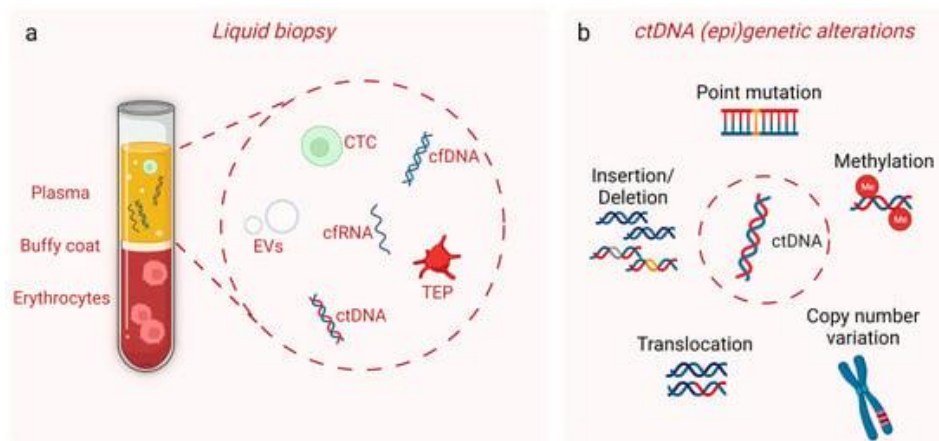
letture a 260 nm e 230 nm è stato utilizzato per escludere una contaminazione da ioni fenolato, tiocianati ed altri composti organici, con un rapporto ottimale di 2,2. La misurazione del RNA è stata valutata con il rapporto tra le letture a 260 nm e 280 nm e il rapporto tra le letture a 260 nm e 230 nm con un rapporto ottimale in entrambe le letture di 2.

Successivamente utilizzando il kit EasyPGX qPCR instrument 96 (Diatech Pharmacogenetics s.r.l., Ancona, Italy), con rielaborazione del dato mediante EasyPGX Analysis Software (Diatech Pharmacogenetics s.r.l., Ancona, Italy), la Real-Time PCR ha fornito una concentrazione più accurata degli acidi nucleici espressa in ng/ml e l'indice di frammentazione specifico, considerando il campione ideo se con indice <0.3.

#### 4.2 Estrazione cfDNA da prelievo venoso

I pazienti sono stati inviati al laboratorio analisi per il prelievo di sangue venoso, dal quale è stato successivamente estratto il DNA tumorale circolante. Il prelievo venoso, destinato all'isolamento del DNA libero circolante (cell-free DNA, cfDNA), che include il DNA tumorale circolante (ctDNA) di nostro interesse, è stato conservato in provette Streck, che ne garantiscono la stabilizzazione. Dopo una centrifuga di 10 minuti a 2.000 rpm e una di 10 minuti a 4.000 rpm, il ctDNA è stato estratto mediante kit MagCore Circulating DNA Large Volume Kit (4ml) su estrattore automatico MagCore System (Diatech Pharmacogenetics s.r.l., Ancona, Italy).

Il DNA estratto è stato successivamente quantizzato mediante Real-Time PCR utilizzando il kit EasyPGX qPCR instrument 96 (Diatech Pharmacogenetics s.r.l., Ancona, Italy), con rielaborazione del dato da parte del EasyPGX Analysis Software (Diatech Pharmacogenetics s.r.l., Ancona, Italy), ottenendo la concentrazione degli acidi nucleici espressa in ng/ml e l'indice di frammentazione specifico, considerando il campione idoneo se con indice <0.3.



**Figura 10** I biomarcatori della biopsia liquida: cellule tumorali circolanti (CTC), DNA tumorale circolante (ctDNA), RNA libero da cellule (cfRNA), vescicole extracellulari (EV) e piastrine istruite dal tumore (TEP) e le informazioni riscontrabili dall'analisi del ctDNA. (Fonte: <https://doi.org/10.3390/cells12121573>)

#### 4.3 Spettrometria di massa (MALDI-TOF)

L'analisi delle mutazioni nei tessuti di polmone e colon-retto è stata eseguita utilizzando la spettrometria di massa MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) con i kit specifici Myriapod Colon Status e Myriapod e Lung Status (Diatech Pharmacogenetics). Questi kit sono progettati per identificare mutazioni nei geni associati a diverse neoplasie.

Il kit Myriapod Colon Status è stato impiegato per rilevare mutazioni nei geni *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* e *PIK3CA*, geni chiave coinvolti nella carcinogenesi del colon-retto. I tessuti tumorali sono stati analizzati secondo le istruzioni del produttore, con l'obiettivo di identificare mutazioni specifiche nelle sequenze target di questi geni.

Il kit Myriapod Lung Status è stato utilizzato per determinare le mutazioni nei geni *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA*, *ALK*, *ERBB2*, *DDR2*, *RET* e *MAP2K1*, che giocano un ruolo centrale nella patogenesi e nella risposta terapeutica del carcinoma polmonare. Anche in questo caso, l'analisi è stata condotta seguendo le linee guida del produttore.

La spettrometria di massa ha permesso una rapida e precisa identificazione delle varianti genetiche attraverso la rilevazione delle differenze nei pesi molecolari tra i nucleotidi wild-type e mutati utilizzando una tecnica di ionizzazione detta Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) in cui l'eccitazione delle molecole del campione viene effettuata tramite un raggio laser, e con un analizzatore di tipo TOF (time of flight, cioè tempo di volo) il quale seleziona gli ioni in base al loro rapporto massa/carica e al tempo che essi impiegano per percorrere l'analizzatore.

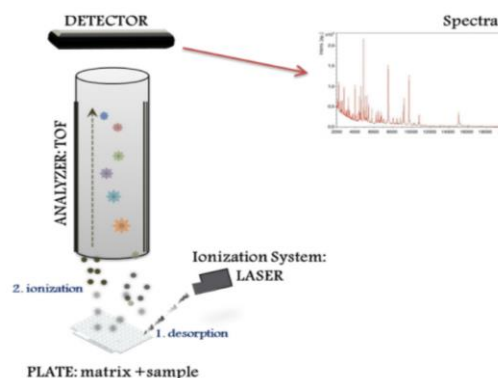


Figura 11 Tecnologia MALDI TOF.

#### 4.4 Pirosequenziamento

Il profilo di metilazione del promotore del gene *MGMT*, che regola l'espressione del gene stesso, è stato valutato tramite pirosequenziamento. Il pirosequenziamento si basa sulla rilevazione dell'intensità luminosa rilasciato al momento dell'incorporazione di un nuovo dNTP nel filamento di DNA in sintesi. Il DNA estratto da tessuto è stato trattato con bisolfito di sodio, che converte le citosine in uracile, mentre le citosine metilate rimangono invariate durante il trattamento. Dopo l'amplificazione su Rotor-Gene 6000 (Corbett Research), la sequenza da analizzare è stata incubata come singolo filamento insieme agli enzimi DNA polimerasi, ATP solforilasi, luciferasi, apirasi e ai substrati adenosina-5'-fosfosolfato (APS) e luciferina. Durante il sequenziamento, all'aggiunta di uno dei quattro dNTP alla reazione la DNA polimerasi ne catalizza l'incorporazione solo se è complementare al nucleotide del filamento stampo. In tal caso, si verifica il rilascio simultaneo di pirofosfato inorganico (PPi). Il PPi prodotto viene quindi convertito in ATP dall'ATP solforilasi utilizzando l'APS come substrato e l'ATP utilizzata per ottenere l'ossiluciferina con rilascio di fluorescenze, che viene appunto captata dal sistema. È stato così ottenuto il grado di metilazione di dieci isole CpG del promotore di *MGMT* nei campioni di glioblastoma mediante kit *MGMT* plus (Diatech Pharmacogenetics s.r.l., Ancona, Italy) su sequenziatore PyroMark Q96 ID System (Qiagen, Germania) (**Figura 12**).



Figura 12 PyroMark Q96 ID System (Qiagen, Germania).

#### 4.5 Real-Time PCR

Sono state amplificate in modo selettivo, utilizzando opportuni primer, le principali zone geniche di interesse con lo strumento Real Time easy PGX (Diatech Pharmacogenetics s.r.l., Ancona, Italy) (*Figura 13*).

Con l'utilizzo di sonde fluorescenti marcate con FAM e HEX, lo strumento rileva inoltre la fluorescenza emessa e al termine della reazione, generando una curva di amplificazione che permette di determinare la presenza di mutazioni.

I kit utilizzati per la rilevazione delle principali mutazioni in geni specifici associati a tessuti oncologici sono: EasyPGX ready *BRAF*, EasyPGX ready *NRAS*, EasyPGX ready *KRAS*, EasyPGX ready *EGFR*, EasyPGX ready *MGMT*, EasyPGX ready *IDH* e EasyPGX ready *ALK/ROS1/MET/RET* (Diatech Pharmacogenetics s.r.l., Ancona, Italy).



*Figura 13 Real-Time easyPGX (Diatech Pharmacogenetics s.r.l., Ancona, Italy).*

Il software EasyPGX Analysis Software (Diatech Pharmacogenetics s.r.l., Ancona, Italy) interpreta automaticamente i risultati in base alla curva sigmoide (*Figure 14 e 15*) e ai valori del Ct. La presenza della mutazione viene indicata se il segnale di fluorescenza supera una determinata soglia.



**Figura 14** Esempio di risultato Real-Time PCR positivo per la variante V660E di BRAF.



**Figura 15** Esempio di risultato Real-Time PCR positivo per il riarrangiamento dell'ex 12 del gene RET.

#### 4.6 Next Generation Sequencing

I campioni di RNA, ottenuti da tessuto FFPE, sono stati retro-trascritti su piattaforma EasyPGXqPCR instrument 96 (Diatech Pharmacogenetics s.r.l., Ancona, Italy), al fine di ottenere il cDNA per il sequenziamento.

Per la creazione delle Librerie, il DNA somatico o cDNA ottenuto da tessuto FFPE o plasma è stato frammentato, amplificato e arricchito con l'aggiunta di indici specifici per identificazione di ciascun campione, e di adattatori, che permettono l'immobilizzazione dei frammenti ottenuti sul supporto solido del sistema "flowcell", al fine di sequenziare tutti i frammenti in parallelo. La preparazione delle Librerie è avvenuta mediante kit: Myriapod NGS BRCA1-2 panel- NG035 (Diatech Pharmacogenetics s.r.l., Ancona, Italy), specifico per i geni BRCA1 e BRCA2; Myriapod NGS Cancer Panel DNA (Diatech Pharmacogenetics s.r.l., Ancona, Italy), pannello a 16 geni (*ALK, BRAF, EGFR, ERBB2, FGFR3, HRAS, IDH1/2, KIT, KRAS, MET, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RET, ROS1, POLE*) e Myriapod NGS Cancer Panel RNA (Diatech Pharmacogenetics s.r.l., Ancona, Italy), per il pannello RNA 10 geni (*ALK, ROS1, RET, MET, PPARG, FGFR2, FGFR3, NTRK1, NTRK2, NTRK3*).

Il pool di librerie DNA o cDNA ottenuto è stato quantificato al Qubit fluorometer (Thermo Fisher Scientific inc.) con Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific inc).

Il sequenziamento è stato effettuato su piattaforma Illumina, nello specifico: iSeq System e Mi-Seq System (Illumina, San Diego, CA, USA).

Nella tecnologia Illumina i frammenti di DNA generati delle Librerie si legano mediante gli adattatori agli oligonucleotidi complementari presenti sulla piattaforma di sequenziamento, e fungono da innesco per la reazione di amplificazione a ponte clonale, generando dei cluster per ogni filamento. La polimerasi aggiunge i nucleotidi coniugati con fluorofori complementari al ssDNA e ad ogni nucleotide incorporato viene rilevata la fluorescenza emessa.

Sono state così ottenute migliaia di *reads* per frammento, ovvero sequenze di poche centinaia di basi che si sono generate dall'amplificazione di una determinata regione cromosomica; il numero delle *reads* ottenute per frammento costituisce il *coverage*, la copertura che ogni sequenze del DNA d'interesse ha

ottenuto, fondamentale per la veridicità e rappresentatività del dato. Varianti con *coverage* inferiore a 500 vengono scartate dall'analisi genomica dei campioni. Le *reads* sono state quindi allineate sul genoma di riferimento. L'allineamento delle sequenze in hg19 e l'identificazione delle varianti sono stati eseguiti utilizzando il software di analisi Myriapod NGS Data Analysis Software (Diatech Pharmacogenetics s.r.l., Ancona, Italy).



**Figura 16** Strumenti iSeq e MiSeq Illumina.

#### 4.7 Raccolta dei dati e analisi

I dati relativi all'attività di refertazione del laboratorio di diagnostica molecolare dei tumori solidi della SOD di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria delle Marche (AOUM), dal 2021 al 2023, sono stati raccolti dal Sistema Informatico di reparto e tabulati su File di Excel.

I dati relativi alla diagnosi molecolare sono stati suddivisi in modo sistematico in base alla metodica utilizzata per ciascuna analisi. Successivamente, sono stati classificati in funzione degli esiti ottenuti, distinguendo i risultati positivi, negativi e non valutabili. Infine, per ciascuna metodica, sono stati riportati i casi totali, consentendo una visione complessiva e comparativa delle performance di ciascun approccio diagnostico utilizzato.

## 5. Risultati

Il laboratorio di diagnostica molecolare dei tumori solidi della SOD di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria delle Marche (AOUM), dal 2021 al 2023, ha prodotto un numero totale di referti di biologia molecolare di 779 nel 2021, 1121 nel 2022 e 1017 nel 2023.

*Tabella 1 Dati attività di diagnosi molecolare della SOD di Anatomia Patologica AOUM anno 2021*

2021				
METODICA	POSITIVI	NEGATIVI	NON VALUTABILI	N. CASI TOTALI PROCESSATI
MALDI-TOF Colon Status (principali mutazioni in KRAS-BRAF-NRAS-PIK3CA)	143 (66,82%)	70 (32,71%)	1 (0,47%)	214
MALDI-TOF Lung Status (principali mutazioni in EGFR-KRAS-BRAF-NRAS-PIK3CA- ALK-ERBB2-DDR2-RET-MAP2K1)	149 (54,78%)	120 (44,12%)	3 (1,10%)	272
NGS 16 geni (ALK-BRAF-EGFR-ERBB2-FGFR3-HRAS-IDH1-2-NRAS-KIT-KRAS-MET-ROS1-PDGFR-PIK3KA-RET-POLE)	89 (65,93%)	45 (33,33%)	1(0,74%)	135
NGS RNA 10 geni (ALK-ROS1-RET-MET-PPARG-FGFR2-FGFR3-NTRK1-NTRK2-NTRK3)	0	4 (50%)	4 (50%)	8
Real-Time easy-PGX BRAF	12 (35,29%)	22 (64,71%)	0	34
Real-Time easy-PGX NRAS	1 (2,85%)	34 (97,14%)	0	35
Real-Time easy-PGX KRAS	6 (27.27%)	16 (72,73%)	0	22
Real-Time easy-PGX EGFR	0	0	1 (100%)	1
Real-Time easy-PGX NTRK	0	19 (100%)	0	19
Real-Time easy-PGX ALK/ROS1/MET/RET	4 (25%)	12 (75%)	0	16
	metilato	non metilato	indeterminato	
Pyrosequencing kit MGMT plus	21 (91,30%)	2 (8,70%)	0	23

Negli anni 2021 e 2022, presso la SOD di Anatomia Patologica dell'AOUM, le analisi molecolari sono state principalmente svolte mediante spettrometria di massa con pannelli specifici per marcatori dei tumori colon-retto (MALDI-TOF Colon Status) e polmonare (MALDI-TOF Lung Status).

A partire da giugno 2021, sono stati processati e referti i primi dati di sequenziamento NGS DNA (pannello da 16 geni) e RNA (pannello da 10 geni); con un totale di 135 campioni NGS DNA a 16 geni; di cui 89 positivi, 45 negativi e 1 non valutabile e 8 campioni totali di RNA a 10 geni; di cui 4 risultati negativi e 4 non valutabili. Dalla percentuale di casi positivi, negativi e non valutabili ottenuti con spettrometria di massa e NGS DNA, si evince che le due metodiche sono ugualmente applicabili su casi di FFPE DNA, avendo percentuali di successo e insuccesso confrontabili (casi non valutabili rispettivamente 0,47% per la spettrometria di massa e 0,74% per l'NGS), con il vantaggio nell'utilizzo della metodica NGS di una maggior quantità di informazioni ottenute.

Nell'anno 2021 è stato inoltre implementato anche l'utilizzo dei kit di Real-Time PCR per la valutazione dei geni in singolo e per la valutazione dei riarrangiamenti, quali il kit Real-Time easy-PGX *ALK/ROS1/MET/RET*; i quali risultano ampiamente efficienti su tessuto FFPE, avendo una percentuale di non valutabili pari a zero.

In fine, per la valutazione del profilo di metilazione del gene *MGMT* nei casi di glioblastoma avanzato, nel 2021 è stato effettuato il pirosequenziamento con una percentuale di casi non valutabile pari a zero e di positivi del 91,30%.

**Tabella 2** Dati attività di diagnosi molecolare della SOD di Anatomia Patologica AOUM anno 2022

2022				
METODICA	POSITIVI	NEGATIVI	NON VALUTABILI	N. CASI TOTALI PROCESSATI
MALDI-TOF Colon Status (principali mutazioni in KRAS-BRAF-NRAS-PIK3CA)	196 (65,12%)	102 (33,89%)	3 (1%)	301
MALDI-TOF Lung Status (principali mutazioni in EGFR-KRAS-BRAF-NRAS-PIK3CA- ALK-ERBB2-DDR2-RET-MAP2K1)	78 (57,78%)	56 (41,48%)	1 (0,74%)	135
NGS 16 geni (ALK-BRAF-EGFR-ERBB2-FGFR3-HRAS-IDH1-2-NRAS-KIT-KRAS-MET-ROS1-PDGFR-PIK3KA-RET-POLE)	219 (60,33%)	135 (37,19%)	9 (2,48%)	363
NGS 16 geni su cfDNA	5 (38,46%)	8 (61,53%)	0	13
NGS BRCA1/BRCA2	6 (23,08%)	10 (34,61%)	10 (38,46%)	26
NGS RNA 10 geni (ALK-ROS1-RET-MET-PPARG-FGFR2-FGFR3-NTRK1-NTRK2-NTRK3)	2 (9,09%)	8 (36,36%)	12 (54,54%)	22
Real-Time easy-PGX BRAF	27 (45,76%)	31 (18,64%)	1 (1,69%)	59
Real-Time easy-PGX NRAS	3 (5,66%)	50 (94,34%)	0	53
Real-Time easy-PGX KRAS	3 (6,52%)	43 (93,48%)	0	46
Real-Time easy-PGX EGFR	1 (50%)	1 (50%)	0	2
Real-Time easy-PGX NTRK	0	34 (100%)	0	34
Real-Time easy-PGX ALK/ROS1/MET/RET	19 (59,38%)	11 (34,37%)	2 (6,25%)	32
	metilato	non metilato	indeterminato	
Pyrosequencing kit MGMT plus	27 (71,05%)	6 (15,79%)	5 (13,16%)	38

Nell'anno 2022 oltre alla progressiva sostituzione delle analisi del DNA da FPPE mediante spettrometria di massa con l'NGS (aumento significativo con 363 casi totali di NGS DNA 16 geni) è stato introdotto per i casi di NSCLC il sequenziamento dei 16 geni su cfDNA da plasma, biopsia liquida; con una percentuale del 38,46% di casi refertati come positivi, 61,53% come negativi e nessun caso non valutabile.

Nello stesso anno, è stato validato, inoltre, il sequenziamento completo dei geni *BRCA1* e *BRCA2* su tessuto prostatico e ovarico. La percentuale di casi non

valutabile per questa metodi è del 38,46% nel 2022 (**Tabella 2**) e del 48,15% nel 2023 (**Tabella 3**), imputabile alla bassa qualità del DNA estratto dai campioni FFPE.

In fine, dai dati relativi all'anno 2022 (**Tabella 2**) è evidente un aumento del numero di casi analizzati in Real-Time per singoli geni ed è maggiore il numero di casi RNA sequenziati con pannello 10 geni; con il 6,25% di positivi, 31,25% di negativi e 37,5% di casi non valutabili, causa dell'elevata instabilità della molecola di RNA.

**Tabella 3** Dati attività di diagnosi molecolare della SOD di Anatomia Patologica AOUM del 2023.

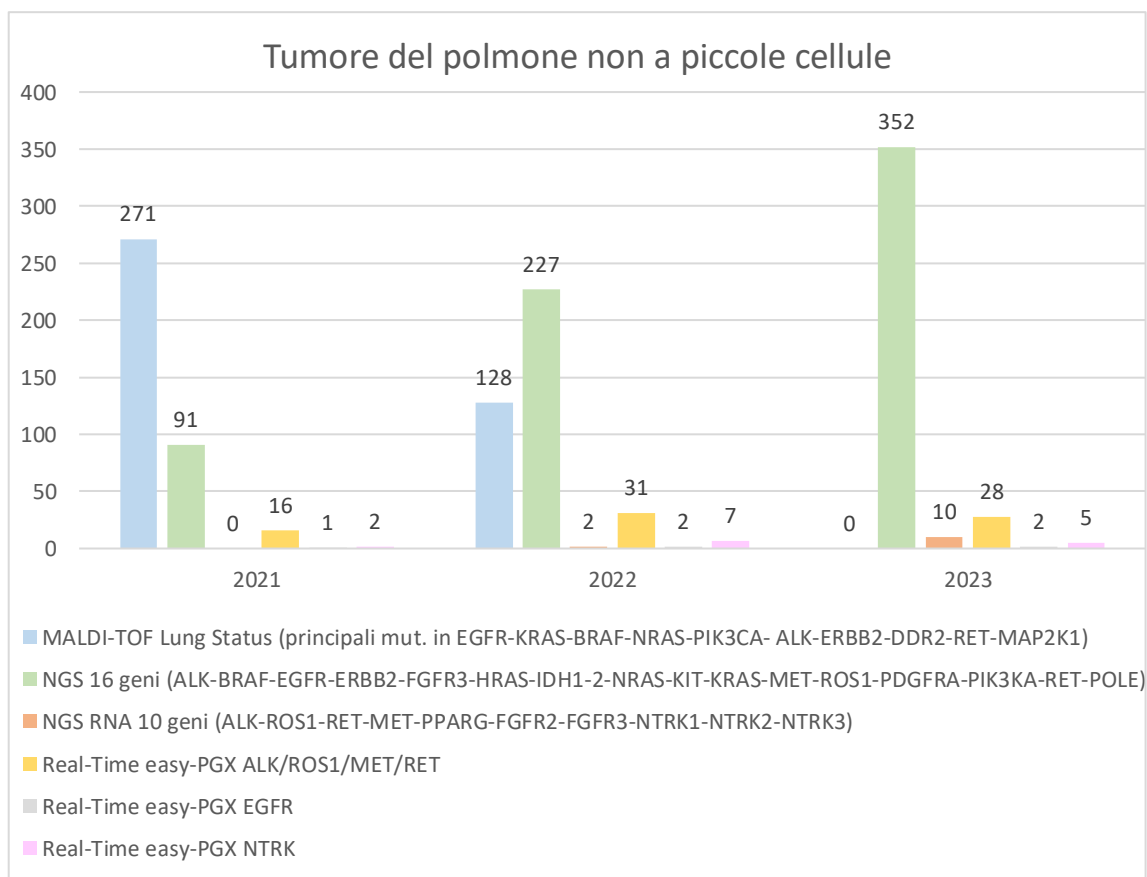
2023				
METODICA	POSITIVI	NEGATIVI	NON VALUTABILI	N. CASI TOTALI PROCESSATI
MALDI-TOF Colon Status (principali mutazioni in KRAS-BRAF-NRAS-PIK3CA)	1 (100%)	0	0	1
MALDI-TOF Lung Status (principali mutazioni in EGFR-KRAS-BRAF-NRAS-PIK3CA- ALK-ERBB2-DDR2-RET-MAP2K1)	0	0	0	0
NGS 16 geni (ALK-BRAF-EGFR-ERBB2-FGFR3-HRAS-IDH1-2-NRAS-KIT-KRAS-MET-ROS1-PDGFR-PIK3KA-RET-POLE)	475 (66,99%)	209 (29,48%)	25 (3,53%)	709
NGS 16 geni su cfDNA	2 (22,22%)	6 (66,67%)	1 (11,11%)	9
NGS BRCA1/BRCA2	5 (6,17%)	37 (45,68%)	39 (48,15%)	81
NGS RNA 10 geni (ALK-ROS1-RET-MET-PPARG-FGFR2-FGFR3-NTRK1-NTRK2-NTRK3)	1 (2,44%)	20 (48,78%)	20 (48,78%)	41
Real-Time easy-PGX BRAF	18 (40,91%)	24 (54,55%)	2 (4,55%)	44
Real-Time easy-PGX NRAS	10 (22,73%)	32 (72,73%)	2 (4,55%)	44
Real-Time easy-PGX KRAS	1 (20%)	3 (60%)	1 (20%)	5
Real-Time easy-PGX EGFR	1 (50%)	1 (50%)	0	2
Real-Time easy-PGX NTRK	0	16 (88,89%)	2 (11,11%)	18
Real-Time easy-PGX ALK/ROS1/MET/RET	14 (48,28%)	13 (44,83%)	2 (6,90%)	29
	metilato	non metilato	indeterminato	
Pyrosequencing kit MGMT plus	24 (75%)	3 (9,38%)	5 (15,62%)	32
Real-Time easy-PGX MGMT	3 (60%)	2 (40%)	0	5

Nell'ultimo anno (2023) è stata totalmente sostituita la spettrometria di massa con il sequenziamento NGS (**Tabella 3**); passando da un totale di 214 casi (Colon

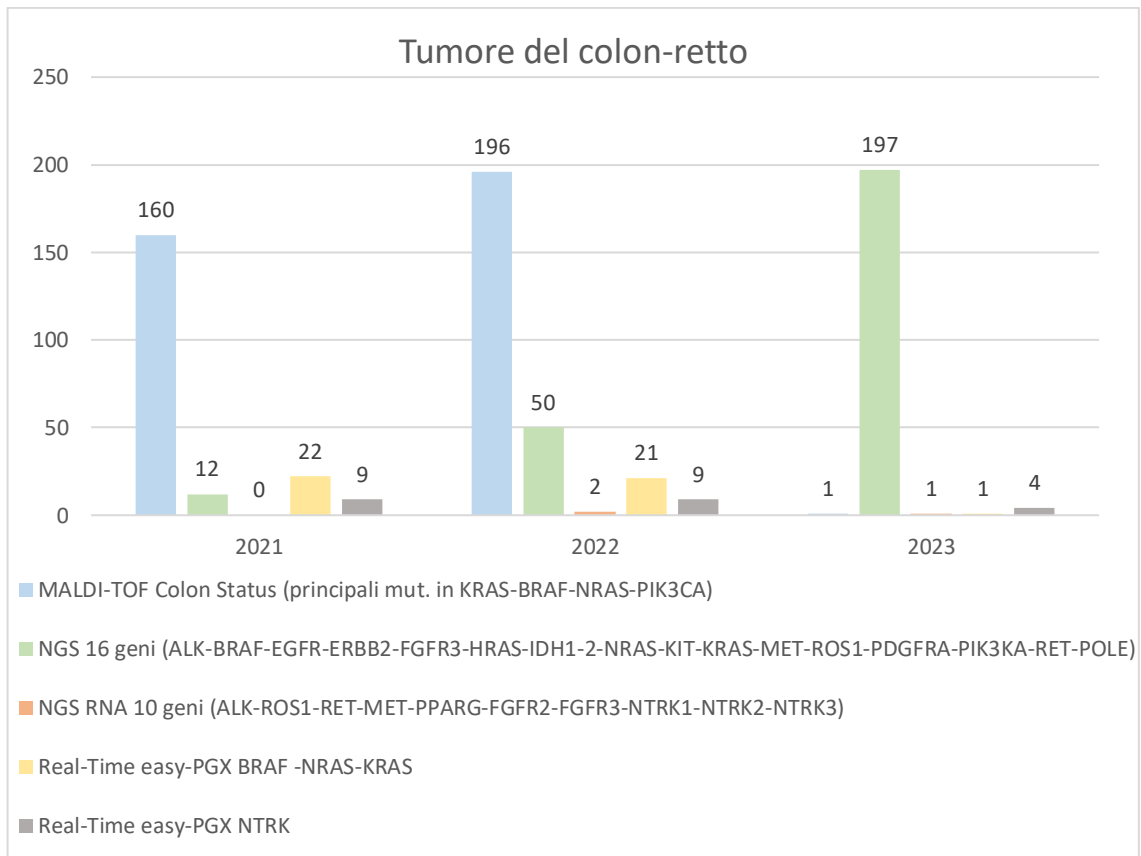
Status 2021) e 272 casi (Lung Status 2021) (**Tabella 1**) a 1 unico caso analizzato mediante spettrometria di massa per Colon Status e un totale di 709 casi analizzati con sequenziamento DNA a 16 geni (**Tabella 3**), con risultati percentuali confrontabili.

La percentuale di dati risultati non valutabili per l'analisi di metilazione del promotore del gene *MGMT* in pirosequenziamento risultava del 13,16% nel 2022 (**Tabella 2**) e nel 2023 (**Tabella 3**). Nel corso del 2023 è stata sostituita con Real-Time e già nei primi casi si osserva una percentuale di dati non valutabile pari a zero (**Tabella 3**).

I dati sono stati successivamente discriminati per patologia; ottenendo un prospetto delle metodiche utilizzate per ogni specifica lesione tumorale.

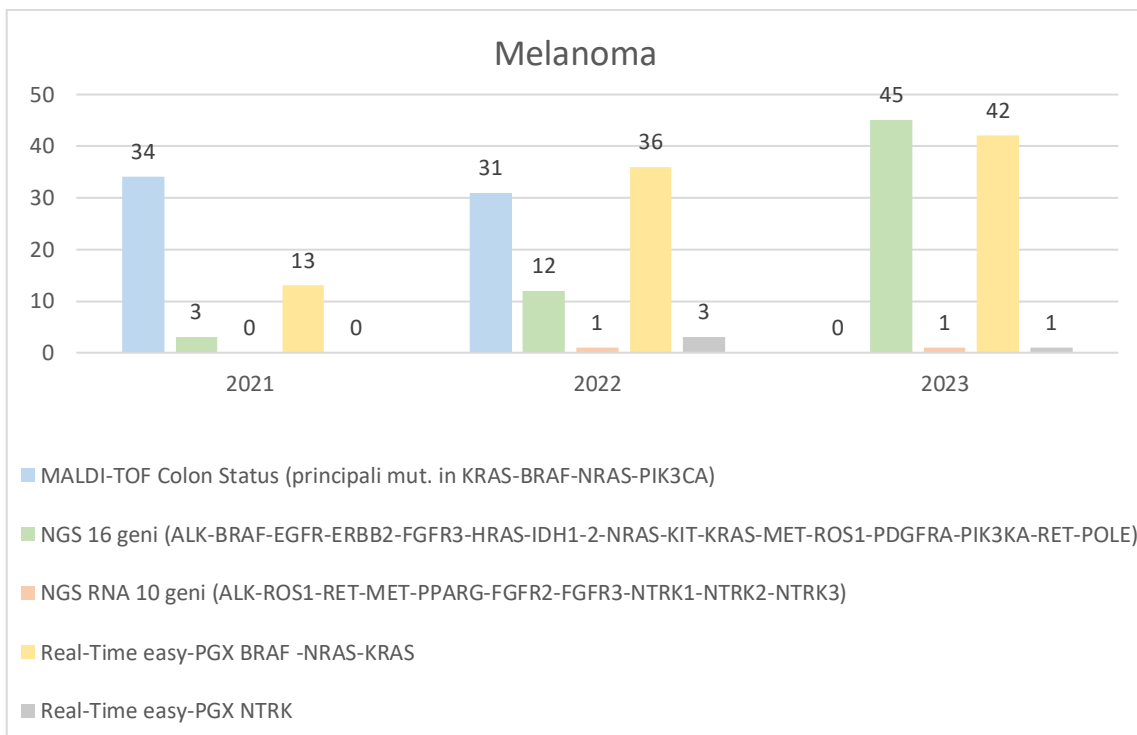


**Figura 17** Distribuzione tecniche molecolari su NSCLC 2021-2023

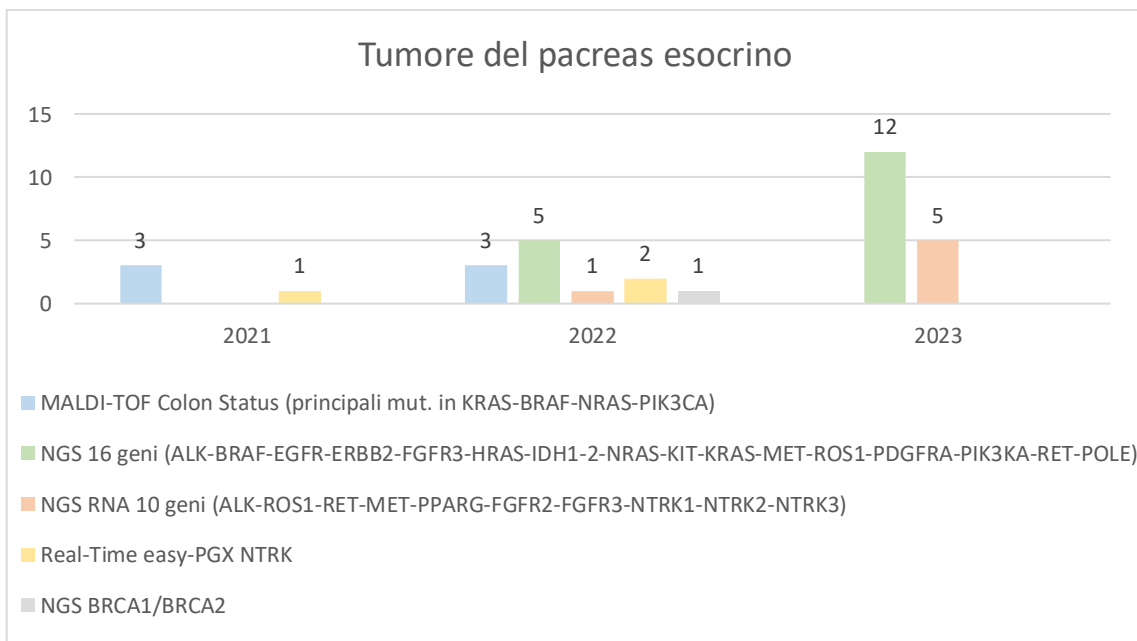


**Figura 18** Distribuzione tecniche molecolari su tumore colon-retto 2021-2023

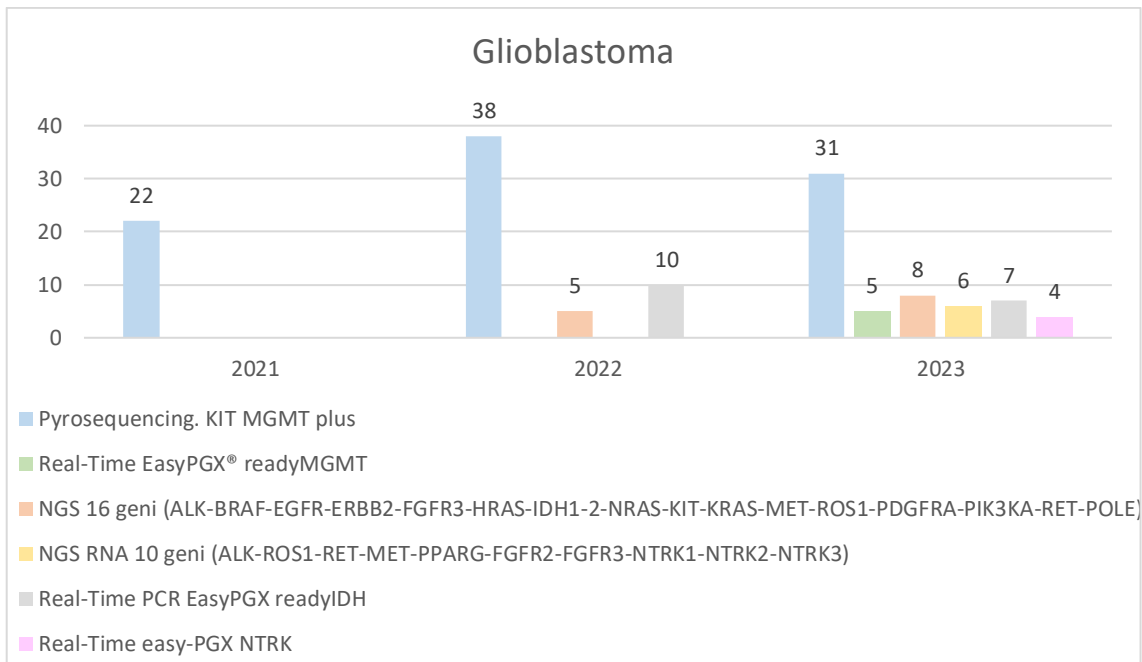
Per entrambe le lesioni, polmonari e del colon-retto, è evidente la progressiva sostituzione dei pannelli specifici Colon Status e Lung Status della spettrometria di massa con la tecnologia NGS ed analisi dei 16 geni (**Figura 17 e 18**).



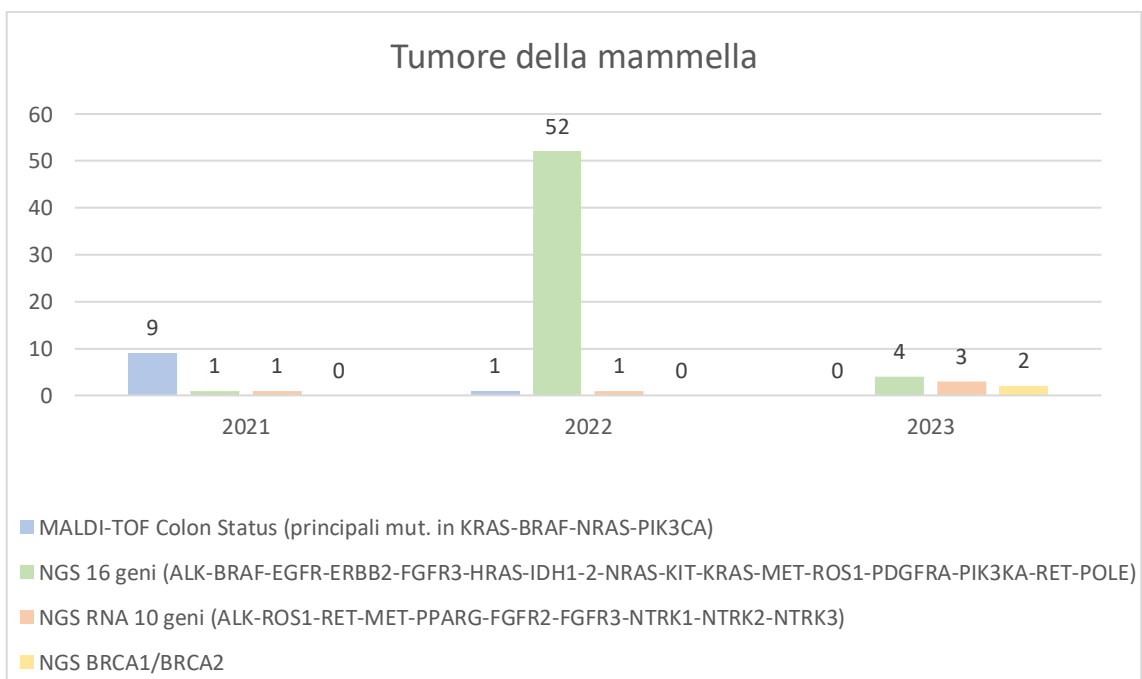
**Figura 19** Distribuzione tecniche molecolari su Melanoma 2021-2023



**Figura 20** Distribuzione tecniche molecolari su tumore del pancreas esocrino 2021-2023



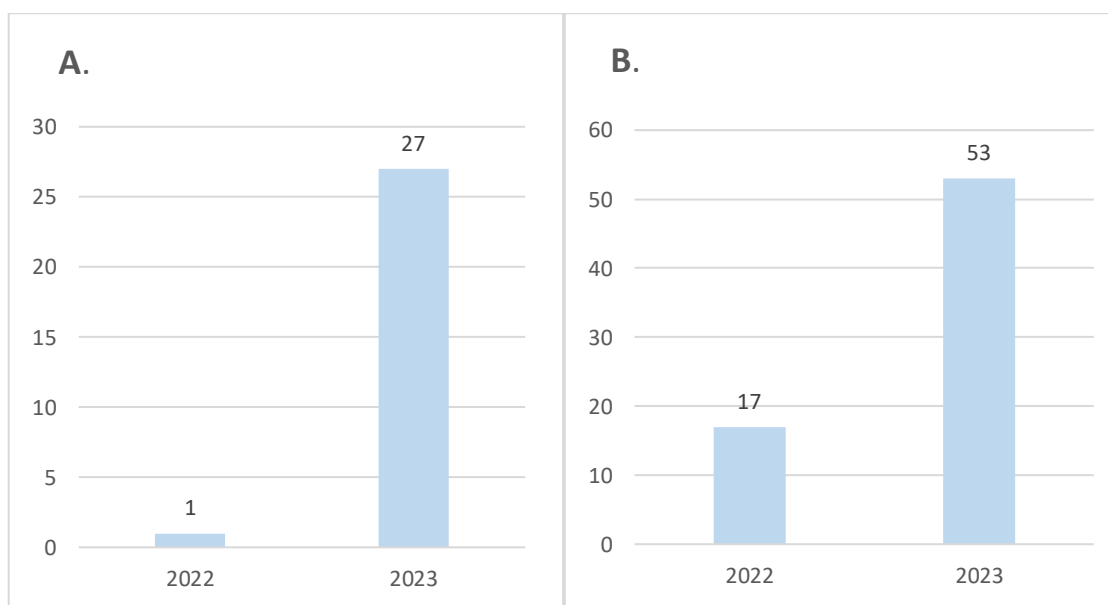
**Figura 21** Distribuzione tecniche molecolari su glioblastoma 2021-2023



**Figura 22** Distribuzione tecniche molecolari su tumore della mammella 2021-2023

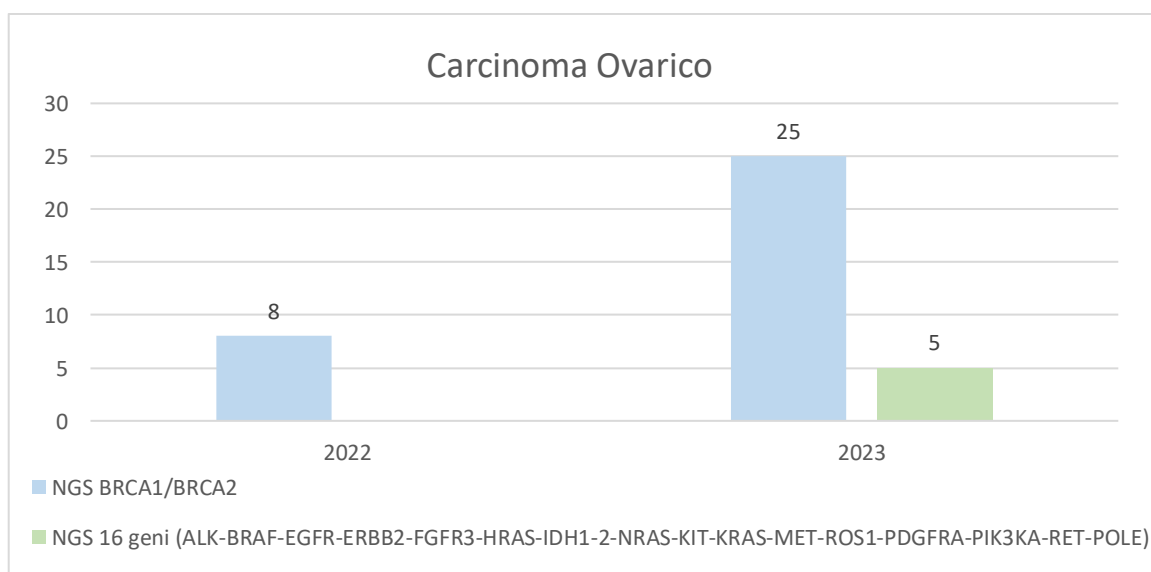
Dai dati ottenuti è evidente l'aumento generale del numero di lesioni su cui è stata effettuata un'analisi molecolare, sia tramite NGS che Real-Time PCR. Per il Melanoma, oltre alla sostituzione della spettrometria di massa con NGS risulta importante anche l'implementazione delle analisi in Real-Time PCR di *BRAF*,

*NRAS* e *KRAS*, che con un sospetto oncologico mirato forniscono un dato utile e rapido. (**Figura 19**). Mentre, nella diagnosi del Glioblastoma, si passa dalla sola valutazione del gene *MGMT* con pirosequenziamento nel 2021 ad una tipizzazione più ampia, sia mediante Real-Time per *IDH* che da NGS RNA di 10 geni nel 2023 (**Figura 21**).



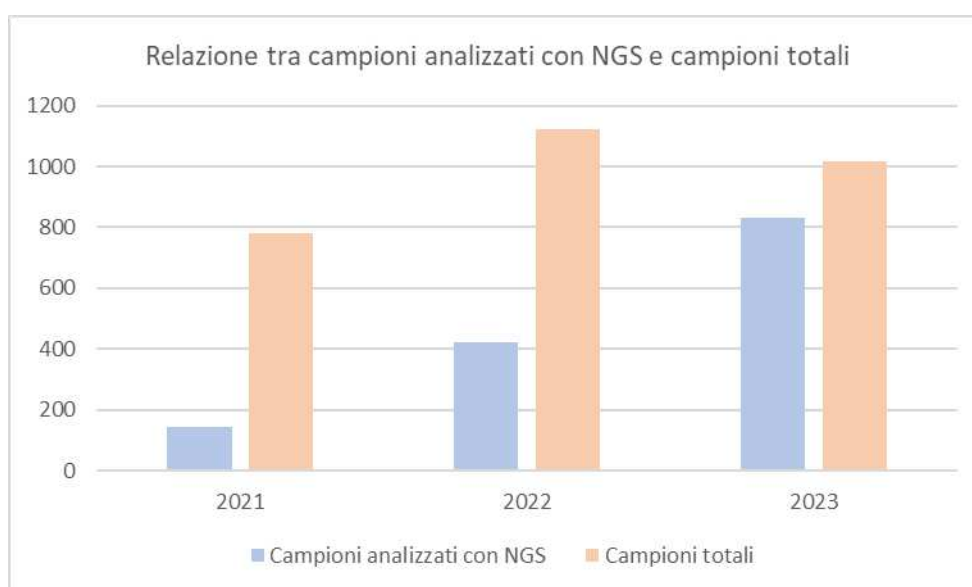
**Figura 23 A.** Dati sequenziamento NGS DNA 16 geni su carcinoma dell'endometrio 2022-2023.

**B.** Dati sequenziamento NGS BRCA1/2 su casi di carcinoma prostatico 2022-2023



**Figura 24** Distribuzione sequenziamento NGS 16 geni e NGS BRCA1/2 su carcinoma ovarico 2022-2023.

Il sequenziamento dei geni *BRCA1* e *BRCA2* dall'introduzione nel 2022 è giustamente aumentato nell'anno 2023 su casi prostatico e ovarici, per l'importante ruolo prognostico e di scelta terapeutica. L'importante percentuale di non valutabili (**Tabella 2 e 3**), dovuta a scarsa qualità e frammentazione del DNA ottenuto da FPPE, suggeriscono una metodica alternativa soprattutto per i casi prostatici che risultano più sensibili alla frammentazione del DNA da fissazione in formalina.



**Figura 25** Relazione tra il numero dei campioni analizzati con NGS e i campioni totali negli anni 2021, 2022 e 2023

Il grafico della Figura 25 evidenzia una netta crescita del numero di casi totali processati nel laboratorio di Biologia Molecolare della SOD Anatomia Patologica di Ancona tra il 2021 il 2022 e, in particolare, un notevole aumento dei casi analizzati tramite Next Generation Sequencing (NGS) dal 2021 al 2023. Si osserva un trend positivo che sottolinea la crescente adozione della metodica NGS nelle analisi molecolari oncologiche, con un incremento significativo sia in termini assoluti che relativi rispetto al totale dei casi processati dal laboratorio.

## 6. Discussione

L'evoluzione delle tecnologie molecolari ha avuto un impatto profondo sulla diagnosi oncologica e sulla gestione dei pazienti, rivoluzionando l'approccio tradizionale basato principalmente su criteri morfologici.<sup>113</sup> Lo studio condotto presso la SOD di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria delle Marche evidenzia come l'introduzione di metodiche avanzate, quali la Real-Time PCR e in maggior misura il Sequenziamento di Nuova Generazione (NGS), abbia migliorato significativamente la capacità di rilevare mutazioni genetiche, supportando in modo più preciso le decisioni cliniche.

Uno dei principali problemi riscontrati riguarda la qualità del DNA ottenuto dai campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), soprattutto per quanto riguarda i campioni di prostata e polmone.<sup>114</sup> Questi campioni, sebbene ampiamente utilizzati in ambito clinico, subiscono un'alterazione del materiale genetico a causa dei processi di fissazione, che possono compromettere l'accuratezza delle analisi molecolari. Questo aspetto ha portato a una percentuale non trascurabile di casi non valutabili, con conseguenti limitazioni nella capacità di fornire risposte diagnostiche e terapeutiche tempestive.<sup>115</sup>

In questo contesto, la biopsia liquida si presenta come una soluzione promettente per superare le limitazioni associate all'analisi dei tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE).<sup>116</sup> L'ottenimento di DNA tumorale circolante (ctDNA) da campioni di sangue offre diversi vantaggi significativi: è una procedura minimamente invasiva, consente il monitoraggio della malattia in tempo reale e la rilevazione di eventuali eterogeneità tumorale.<sup>117</sup> Inoltre, la biopsia liquida facilita la valutazione della risposta ai trattamenti e il monitoraggio delle recidive, consolidandosi come una componente fondamentale della medicina di precisione.<sup>118</sup>

Sebbene l'applicazione della biopsia liquida sia ben consolidata nella gestione del tumore al polmone, per altre neoplasie, come il tumore alla prostata e il tumore ovarico, questa tecnologia è ancora in fase di sperimentazione. Attualmente, la comunità scientifica è attivamente coinvolta nella ricerca per validare l'efficacia della biopsia liquida in questi contesti, puntando a

determinarne il ruolo nella diagnosi precoce e nella personalizzazione dei trattamenti.<sup>119</sup>

Un altro aspetto cruciale per il futuro della diagnostica oncologica è il continuo sviluppo di nuove piattaforme tecnologiche e pannelli genetici più ampi, che consentiranno di analizzare in modo sempre più completo il profilo molecolare dei tumori. L'investimento in nuovi strumenti e la formazione del personale sono aspetti chiave per garantire un uso efficace di queste tecnologie.<sup>120</sup>

Le evidenze raccolte in questo studio indicano che l'adozione di tecnologie molecolari avanzate, sebbene ancora in corso di perfezionamento, rappresenta una strada inevitabile verso una diagnostica oncologica più precisa e personalizzata, con il potenziale di migliorare significativamente le prospettive terapeutiche dei pazienti oncologici.

## 7. Conclusioni

L'analisi dei marcatori tumorali è ormai al centro della classificazione delle lesioni oncologiche e della scelta terapeutica mirata.

I dati presentati evidenziano una crescita significativa dell'utilizzo delle tecnologie molecolari e NGS nella diagnosi oncologica nel corso degli anni, sottolineando la crescente importanza di queste metodiche nell'ambito oncologico e, nello specifico, all'interno del laboratorio di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria delle Marche. La spettrometria di massa e il pirosequenziamento sono stati progressivamente sostituiti dal Sequenziamento di Nuova Generazione e dalla Real-Time PCR, ottenendo maggiori informazioni di supporto alle scelte cliniche. L'implementazione di queste tecnologie è ancora in corso nella SOD di Anatomia Patologica, che in questo anno sta investendo sull'introduzione di nuovi strumenti e pannelli più informativi, accompagnata dall'aggiornamento e formazione del personale dedicato.

Restano però alcune criticità nell'utilizzo dell'NGS per l'analisi di DNA da FFPE, il quale si è rivelata spesso troppo alterato dall'inclusione in formalina, causa di un non del tutto trascurabile numero di casi non valutabili. Dal momento che, i marcatori tumorali possono essere anche isolati dal plasma e altri liquidi biologici; la biopsia liquida rappresenta la nuova frontiera dell'oncologia e medicina di precisione. Grazie alla sua accessibilità, ripetibilità e buona qualità del DNA estratto, è considerato un ottimo strumento per la diagnosi precoce, la valutazione prognostica, il monitoraggio e la personalizzazione della terapia, basata su informazioni specifiche del paziente e dell'eterogeneità tumorale.

## Bibliografia

---

- <sup>1</sup> Hyman, D. M., & Taylor, B. S. (2015). Applying genomics to cancer care. *Clinical Cancer Research*, 21(24), 5357-5367. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1260
- <sup>2</sup> Schmidt, M. H. H., & I. A. E. G. (2012). Molecular Diagnostics in Cancer: An Overview. *Molecular Oncology*, 6(3), 178-192. doi:10.1016/j.molonc.2012.03.004
- <sup>3</sup> Chung, T. S., & S. J. K. (2019). The Role of Biomarkers in Cancer Diagnosis. *Current Opinion in Oncology*, 31(1), 47-54. doi:10.1097/CCO.0000000000000497
- <sup>4</sup> Tannock, I. F., & Hickman, J. A. (2016). Molecular Targeted Therapies: A New Paradigm in Cancer Treatment. *Cancer Biology & Therapy*, 17(9), 921-930. doi:10.1080/15384047.2016.1196793
- <sup>5</sup> O'Connor, M. J. (2015). Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Molecular Cell*, 60(4), 547-560. doi:10.1016/j.molcel.2015.10.040
- <sup>6</sup> Dancey, J. E., Bedard, P. L., Onetto, N., & Hudson, T. J. (2012). The Genetic Basis for Cancer Treatment Decisions. *Cell*, 148(3), 409-420. doi:10.1016/j.cell.2012.01.014
- <sup>7</sup> Thoracic Tumours. WHO Classification of Tumours, 5th Edition, IARC, Lyon 2021
- <sup>8</sup> *I numeri del cancro in Italia 2020. AIOM-AIRTUM*
- <sup>9</sup> Crispo A, Brennan P, Jöckel KH, et al. The cumulative risk of lung cancer among current, ex- and never-smokers in European men. *Br J Cancer*. 2004;91:1280-6.
- <sup>10</sup> Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, et al. Best practices recommendations for diagnostic immunohistochemistry in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2019;14:377-407.
- <sup>11</sup> Planchard D, Popat S, Kerr K, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2019;30:863-70. Updated on 15 Sept 2020.
- <sup>12</sup> Hanna NH, Robinson AG, Temin S, et al. Therapy for stage IV Non-Small Cell Lung Cancer With Driver Alterations: ASCO and OH (CCO) Joint Guideline Update. *J Clin Oncol* 2021; 39: 1040-91
- <sup>13</sup> Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350:2129-39.
- <sup>14</sup> Mok TS, Cheng Y, Zhou X, et al., Improvement in overall survival in a randomized study that compared dacomitinib with gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer and egfr-activating mutations. *J Clin Oncol*. 2018;36(22):2244-50.
- <sup>15</sup> Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448:561-6.
- <sup>16</sup> Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2014;371:1963-71.

- 
- <sup>17</sup> Planchard D, Smit EF, Groen HJM, et al., Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017 Oct;18(10):1307-1316.
- <sup>18</sup> Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. *Lancet Oncol.* 2020 Feb;21(2):271-282
- <sup>19</sup> Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive nonsmall-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2016;375:1823-33.
- <sup>20</sup> Mosele F, Remon J, Mateo J, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol* 2020 Nov;31(11):1491-1505.
- <sup>21</sup> (Nagasaka, M., Uddin, M.H., Al-Hallak, M.N. et al. Liquid biopsy for therapy monitoring in early-stage non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* 20, 82 (2021).)
- <sup>22</sup> Le principali cause di morte in Italia, Istituto nazionale di statistica Istat. 2012 Available from: [http://www.istat.it/it/files/2014/12/Principali\\_cause\\_morte\\_2012.pdf](http://www.istat.it/it/files/2014/12/Principali_cause_morte_2012.pdf)
- <sup>23</sup> Johnson CM, Wei C, Ensor JE, et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control* 2013;24:1207-22.
- <sup>24</sup> Compton C.C. Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the colon and rectum, excluding carcinoid tumors, lymphomas, sarcomas, and tumors of the vermiform appendix: a basis for checklists. *Cancer Committee Arch Pathol Lab Med* 2000 Jul;124(7):1016-25.
- <sup>25</sup> Samowitz WS, Curtin K, Wolff RK et al. Microsatellite instability and survival in rectal cancer. *Cancer Causes Control.* 2009;20(9):1763-8.
- <sup>26</sup> Artale S, Sartore-Bianchi A, Veronese SM, et al. Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(25):4217-9.
- <sup>27</sup> Knijn N, Mekenkamp LJ, Klomp M, et al. KRAS mutation analysis: a comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2011;104:1020-6.
- <sup>28</sup> Raccomandazioni AIOM e SIAPEC-IAP per la valutazione delle mutazioni di RAS nel carcinoma del colonretto. Normanno N, Pinto C, Barone C et al.
- <sup>29</sup> De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 2010;11(8):753-62.
- <sup>30</sup> Souglakos J, Philips J, Wang R, et al. Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009;101(3):465-72.
- <sup>31</sup> Gaedcke J, Grade M, Jung K, et al. KRAS and BRAF mutations in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Radiother Oncol.* 2010;94(1):76-81.

- 
- <sup>32</sup> Loree J, Pereira A, Lam M, et al. Classifying colorectal cancer by tumor location rather than sidedness highlights a continuum in mutation profiles and consensus molecular subtypes. *Clin Cancer Res*. 2018;24(5):1062-72.
- <sup>33</sup> Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer*. 2005; 41(1):45-60.
- <sup>34</sup> Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. GLoBoCaN 2008, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer- Base No. 10 [internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>
- <sup>35</sup> Sacchetto L, Zanetti R, Comber H, et al. Trends in incidence of thick, thin and in situ melanoma in Europe. *Eur J Cancer*. 2018; 92:108-18.
- <sup>36</sup> [https://www.iss.it/documents/20126/8403839/LG+127\\_Melanoma\\_agg-ago2023\\_rev-nov.pdf/d1e6e188-6e08-8cd6-5ac7-3e1f83dce7c6?t=1702303171666](https://www.iss.it/documents/20126/8403839/LG+127_Melanoma_agg-ago2023_rev-nov.pdf/d1e6e188-6e08-8cd6-5ac7-3e1f83dce7c6?t=1702303171666)
- <sup>37</sup> Ott PA, Berman RS. Surgical approach to primary cutaneous melanoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2011; 20(1):39- 56.
- <sup>38</sup> Sober AJ, Chuang TY, Duvic M, et al. Guidelines of care for primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2001; 45:579-86.
- <sup>39</sup> The Cancer Genome Atlas Network. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell*. 2015; 16:1681-96.
- <sup>40</sup> Zhang T, Dutton-Regester K, Brown KM, et al. The genomic landscape of cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016; 29:266-83.
- <sup>41</sup> Salerni G, Terán T, Puig S, et al. Meta-analysis of digital dermoscopy follow-up of melanocytic skin lesions: a study on behalf of the International Dermoscopy Society. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013; 27(7):805-14.
- <sup>42</sup> Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, et al. The genetic evolution of melanoma from precursor lesions. *N Engl J Med*. 2015; 373:1926-36.
- <sup>43</sup> Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet*. 2003; 33:19- 20.
- <sup>44</sup> Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2015; 6+386(9992):444-51.
- <sup>45</sup> Long GV, Hauschild A, Santinami M, et al. Adjuvant dabrafenib plus trametinib in stage III BRAF-mutate melanoma. *N Engl J Med*. 2017; 377(19):1813-23.
- <sup>46</sup> The Cancer Genome Atlas Network. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell*. 2015; 16:1681-96.
- <sup>47</sup> Zhang T, Dutton-Regester K, Brown KM, et al. The genomic landscape of cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016; 29:266-83.
- <sup>48</sup> Handolias D, Salemi R, Murray W, et al. Mutations in KIT occur at low frequency in melanomas arising from anatomical sites associated with chronic and intermittent sun exposure. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010; 23(2):210-5.

- 
- <sup>49</sup> [www.cbioportal.org](http://www.cbioportal.org)
- <sup>50</sup> Palmieri G, Capone ME, Ascierto ML, et al. Main roads to melanoma. *J Transl Med.* 2009; 7:86.
- <sup>51</sup> Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, et al. Efficacy of larotrectinib in TRK fusion–positive cancers in adults and children. *N Engl J Med.* 2018; 378:731-9.
- <sup>52</sup> [www.aiom.it/i-farmaci-agnostici-e-il-nuovo-modello-di-oncologia-di-precisione](http://www.aiom.it/i-farmaci-agnostici-e-il-nuovo-modello-di-oncologia-di-precisione)
- <sup>53</sup> NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2021 (JNCCN).
- <sup>54</sup> Asbun HJ, Conlon K, Fernandez-Cruz L, et al. When to perform a pancreatoduodenectomy in the absence of positive histology? A consensus statement by the International Study Group of Pancreatic Surgery. *Surgery.* 2014; 155(5):887-92.
- <sup>55</sup> Dietrich CF, Lorentzen T, Appelbaum L, et al. EFSUMB Guidelines on Interventional Ultrasound (INVUS), Part III – Abdominal treatment procedures. *Ultraschall Med.* 2016; 37(1):27-45.
- <sup>56</sup> Philip PA, Azar I, Xiu J, et al. Molecular characterization of KRAS wild-type tumors in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2022; 28(12):2704-14.
- <sup>57</sup> Smith, J., Doe, A., Johnson, B., et al. (2023). Genomic alterations in KRAS wild-type and KRAS mutant tumors: An analysis of gene fusions and amplifications. *Journal of Clinical Oncology*, 41(15), e1605–e1612. [https://doi.org/10.1200/JCO.2023.41.15\\_suppl.e1605](https://doi.org/10.1200/JCO.2023.41.15_suppl.e1605)
- <sup>58</sup> Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, et al. Efficacy of larotrectinib in TRK fusion-positive cancers in adults and children. *N Engl J Med.* 2018; 378(8):731-9.
- <sup>59</sup> Pishvaian MJ, Blais EM, Brody JR, et al. Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *Lancet Oncol.* 2020; 21(4):508-18.
- <sup>60</sup> Demetri GD, De Braud F, Drilon A, et al. Updated integrated analysis of the efficacy and safety of entrectinib in patients with NTRK fusion-positive solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2022; 28(7):1302-12.
- <sup>61</sup> Grant RC, Denroche R, Jang GH, et al. Clinical and genomic characterisation of mismatch repair deficient pancreatic adenocarcinoma. *Gut.* 2021; 70(10):1894-903.
- <sup>62</sup> Hegi, M. E., et al. (2005). *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma.* New England Journal of Medicine.
- <sup>63</sup> Esteller, M., et al. (2000). *Inactivation of the DNA repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents.* Nature.
- <sup>64</sup> Esteller, M., et al. (2000). *Inactivation of the DNA repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents.* Nature.
- <sup>65</sup> Yan, H., et al. (2009). *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas.* New England Journal of Medicine.
- <sup>66</sup> Cohen, A. L., et al. (2013). *The prognostic and therapeutic significance of IDH mutations in gliomas.* Oncologist.
- <sup>67</sup> Wick, W., et al. (2014). *MGMT testing—the challenges for biomarker-based glioma treatment.* Nature Reviews Neurology.

- 
- <sup>68</sup> Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71(3):209-49.
- <sup>69</sup> Corti C, Antonarelli G, Criscitiello C, et al. Targeting brain metastases in breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2022; 103:102324.
- <sup>70</sup> Schrijver W, Suijkerbuijk KPM, van Gils CH, van der Wall E, Moelans CB, van Diest PJ. Receptor conversion in distant breast cancer metastases: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2018; 110(6):568-80.
- <sup>71</sup> Mateo J, Chakravarty D, Dienstmann R, et al. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). *Ann Oncol.* 2018; 29(9):1895-902.
- <sup>72</sup> Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.* 2002. May 31; 296(5573):1655-7.
- <sup>73</sup> Samuel Y, et al. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;347:21-41.
- <sup>74</sup> Pereira B, et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refine their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat. Commun.* 7:11479 doi:10.1038/ncomms11479 (2016)
- <sup>75</sup> Janku F, et al. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nat Rev Clin Oncol.* 2018 May;15(5):273-291
- <sup>76</sup> Fusco N, Malapelle U, Fassan M, et al. PIK3CA mutations as a molecular target for hormone receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. *Front Oncol.* 2021;11:644737.
- <sup>77</sup> Andre F, Ciruelos EM, Juric D, et al. Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1. *Ann Oncol.* 2021; 32(2):208-17.
- <sup>78</sup> Robson ME, Tung N, Conte P, et al. OlympiAD final overall survival and tolerability results: olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2019; 30(4):558-66.
- <sup>79</sup> Aiom-Airtum: I numeri del cancro in Italia 2020
- <sup>80</sup> Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71: 209-249
- <sup>81</sup> Ali AT. Reproductive factors and the risk of endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2014; 24:384Y393
- <sup>82</sup> Grzelak MM, Chmura Ł, Wróbel PM, Adamek D, Lankosz M, Jach R, Welter E. J Trace Elem Investigation of the role and chemical form of iron in the ovarian carcinogenesis process. *Med Biol.* 2020; 60:1-7
- <sup>83</sup> Prat J, Gallardo A et al. Endometrial carcinoma: pathology and genetics. *Pathology* 2007; 39:72-87.

- 
- <sup>84</sup> Chang YN, Zhang Y et al. Effect of hysteroscopy on the peritoneal dissemination of endometrial cancer cells: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2011; 96:957-61.
- <sup>85</sup> Wiegand KC, Lee AF et al. Loss of BAF250a (ARID1A) is frequent in high-grade endometrial carcinomas. *J Pathol* 2011; 224:328-33.
- <sup>86</sup> Prat J, D'Angelo E, Espinosa I. Ovarian carcinomas: at least five different diseases with distinct histological features and molecular genetics *Hum Pathol* 2018 ;80:11-27
- <sup>87</sup> Paluch-Shimon S, Cardoso F, Sessa C, Balmana J, Cardoso MJ, Gilbert F, Senkus E; Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention and screening. ESMO Guidelines Committee. *Ann Oncol.* 2016; 27 (suppl 5):v103-v110
- <sup>88</sup> Anglesio, M. S., Wang, Y. K., Maassen, M., Horlings, H. M., Bashashati, A., Senz, J., ... & Gilks, C. B. (2013). "Targeted deep sequencing of mucinous ovarian tumors reveals multiple overlapping RAS-pathway activating mutations in borderline and cancerous neoplasms". *BMC Cancer*, 13, 206.
- <sup>89</sup> Broertjes, A. M. C., Peters, E. E. M., Gaarenstroom, K. N., van Altena, A. M., Kenter, G. G., van Beurden, M., & Kluijdt, I. (2023). "Progression-free survival and overall survival after BRCA1/2-associated epithelial ovarian cancer: A matched cohort study". *PLOS ONE*, 18(3), e0274568.
- <sup>90</sup> Li H, Liu ZY, Wu N, Chen YC, Cheng Q, Wang J PARP inhibitor resistance: the underlying mechanisms and clinical implications. *Mol Cancer.* 2020; 19: 107
- <sup>91</sup> Gadducci A, Guerrieri ME. PARP inhibitors alone and in combination with other biological agents in homologous recombination deficient epithelial ovarian cancer: From the basic research to the clinic.. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017; 114: 153-165
- <sup>92</sup> Ledermann JA, Harter P, Gourley C, et al. *Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial.* *Lancet Oncol.* 2014 Jul;15(8):852-861. doi:10.1016/S1470-2045(14)70228-1.
- <sup>93</sup> Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 2013; 497: 67-73. DOI: 10.1038/nature12113.
- <sup>94</sup> Stelloo E, Bosse T, Nout RA, et al. Refining prognosis and identifying targetable pathways for high-risk endometrial cancer; a TransPORTEC initiative. *Mod Pathol* 2015; 28: 836-844. DOI: 10.1038/modpathol.2015.51.
- <sup>95</sup> Piermattei, A., Cianfrini, F., Mulè, A., et al. (2024). "Mismatch Repair Deficiency as a Predictive and Prognostic Biomarker in Endometrial Cancer: A Review on Immunohistochemistry Staining Patterns and Clinical Implications." *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2), 1056. <https://doi.org/10.3390/ijms25021056>
- <sup>96</sup> Talhouk A, McAlpine JN. New Classification of Endometrial Cancers: The Development and Potential Applications of Genomic-based Classification in Research and Clinical Care. *Gynecol Oncol Res Pract* 2016; 3: 14. DOI: 10.1186/s40661-016-0035-7.
- <sup>97</sup> AIOM-AITRUM. I numeri del cancro in Italia. Edizioni Intermedia, Brescia 2020

- 
- <sup>98</sup> AIOM-AIRTUM. I numeri del cancro in Italia. Edizioni Intermedia, Brescia 2019
- <sup>99</sup> Pernar CH, Ebot EM, Mucci LA. The epidemiology of prostate cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018;8:ao30361
- <sup>100</sup> Pilié PG, Johnson AM, Hanson KL et al. Germline genetic variants in men with prostate cancer and one or more additional cancers. *Cancer* 2017; 123:3925-3932.
- <sup>101</sup> Robinson D, Van Allen EM, Wu YM et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 2015;161: 1215-1228
- <sup>102</sup> Lecarpentier J, Silvestri V, Kuchenbaecker KB et al. EMBRACE; GEMO study collaborators; HEBON; KConFab Investigators. Prediction of breast and prostate cancer risks in male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers using polygenic risk scores. *J Clin Oncol* 2017;35:2240-2250
- <sup>103</sup> Helgason H, Rafnar T, Olafsdottir HS et al. Loss-of-function variants in ATM confer risk of gastric cancer. *Nat genet* 2015;47:906-910
- <sup>104</sup> Na R, Zheng SL, Han M et al. Germline mutations in ATM and BRCA1/2 distinguish risk for lethal and indolent prostate cancer and are associated with early age at death. *Eur Urol* 2017;71:740-747
- <sup>105</sup> Wyatt, A. W.; Azad, A. A.; Volik, S. V.; et al. Genomic Alterations in Cell-Free DNA and Enzalutamide Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA oncology* 2016, 2, (12), 1598-1606.
- <sup>106</sup> Abida W, Cyrta J, Heller G et al. Genomic correlates of clinical outcome in advanced prostate cancer [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1902651116](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1902651116)
- <sup>107</sup> Cancer Genome Atlas Research Network. The molecular taxonomy of primary prostate cancer. *Cell* 2015; 163:1011-1025
- <sup>108</sup> Mohler JM, Antonarakis JS, Armstrong AJ et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology. Prostate cancer. Version 2.2019. *J Natl Compr Canc Netw* 2019;17:479-505
- <sup>109</sup> Roobol MJ, Schröder FH, van Leeuwen P, et al. Performance of the prostate cancer antigen 3 (PCA3) gene and prostate-specific antigen in prescreened men: exploring the value of PCA3 for a first-line diagnostic test. *Eur Urol*. 2010;58(4):475–481.
- <sup>110</sup> Rodríguez SVM, García-Perdomo HA. Diagnostic accuracy of prostate cancer antigen 3 (PCA3) prior to first prostate biopsy: A systematic review and meta-analysis. *Can Urol Assoc J*. 2020 May;14(5):E214-E219. doi:10.5489/cuaj.6008. Epub 2019 Nov 29.
- <sup>111</sup> The Cancer Genome Atlas Research Network. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*. 2015 Nov 5;163(4):1011-25. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.025.
- <sup>112</sup> Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005 Oct 28;310(5748):644-8
- <sup>113</sup> Tsimberidou, A.M., Fountzilias, E., Nikanjam, M., & Kurzrock, R. (2020). Review of precision cancer medicine: Evolution of the treatment paradigm. *Cancer Treatment Reviews*, 86, 102019. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102019>
- <sup>114</sup> Bass, B.P., Engel, K.B., Greytak, S.R., & Moore, H.M. (2014). A Review of Preanalytical Factors Affecting Molecular, Protein, and Morphologic Analysis of Formalin-Fixed, Paraffin-

---

Embedded (FFPE) Tissue: How Well Do You Know Your FFPE Specimen? *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 138(11), 1520–1530. <https://doi.org/10.5858/arpa.2013-0691-RA>

<sup>115</sup> Srinivasan, M., Sedmak, D., & Jewell, S. (2002). Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *American Journal of Pathology*, 161(6), 1961–1971. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64472-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64472-0)

<sup>116</sup> Mantovani, A. (2023). *Biopsia liquida: una soluzione promettente per superare le limitazioni della FFPE*. Fondazione Umberto Veronesi. Retrieved from [https://www.fondazioneveronesi.it/articoli/biopsia-liquida-superare-limitazioni-ffpe&#8203;;:contentReference\[oaicite:0\]{index=0}](https://www.fondazioneveronesi.it/articoli/biopsia-liquida-superare-limitazioni-ffpe&#8203;;:contentReference[oaicite:0]{index=0})

<sup>117</sup> Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6(224):224ra24. doi:10.1126/scitranslmed.3007094.

<sup>118</sup> Wan, J.C.M., Massie, C., Garcia-Corbacho, J., Mouliere, F., Brenton, J.D., et al. (2017). Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature Reviews Cancer*, 17(4), 223-238. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.7>

<sup>119</sup> Bach, C. T., et al. (2023). "Clinical relevance of circulating tumor DNA in breast cancer, prostate cancer, and ovarian cancer." *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 180, 103816. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2022.103816.

<sup>120</sup> Malone, E.R., Oliva, M., Sabatini, P.J.B., Stockley, T.L., & Siu, L.L. (2020). Molecular profiling for precision cancer therapies. *Genome Medicine*, 12(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0703-1>