



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

*Dottorato di ricerca in Oncologia e Chirurgia Sperimentali*  
*Dipartimento di Medicina di Precisione in Area Medica, Chirurgica e Critica*  
*(Me.Pre.C.C.)*

**MONITORAGGIO DINAMICO DELLA BIOPSIA LIQUIDA COME  
SURROGATO DELLA RISPOSTA PATOLOGICA COMPLETA E  
DELL' OUTCOME RADIOLOGICO NELLE PAZIENTI  
AFFETTE DA CARCINOMA MAMMARIO SOTTOPOSTE  
A CHEMIOETARPIA NEOADIUVANTE**

Tesi di dottorato:

Dott.ssa Sofia Cutaia

Tutor:

Prof. Antonio Russo

Co-tutor

Prof. Antonio Galvano

Prof. Giuseppe Lo Re

Il Coordinatore:

Prof. Antonio Russo



## INDICE

ABSTRACT

### CAPITOLO I

- 1.1 Background Pag. 6
- 2.2 Scopo dello studio e Obiettivi Pag. 16

### CAPITOLO II

- 2.1 Materiali e Metodi Pag. 18
- 2.1.1 Selezione dei pazienti
- 2.1.2 Caratteristiche dei pazienti
- 2.1.3 Strategia terapeutica
- 2.1.4 Raccolta del plasma e isolamento del cfDNA

### CAPITOLO III

- 3.1 Risultati Pag. 23

### CAPITOLO VI

- 4.1 Discussione Pag. 29
- 4.2 Prospettive future Pag. 33

BIBLIOGRAFIA Pag. 35

## ABSTRACT

Il carcinoma della mammella è la neoplasia a più alta incidenza e prevalenza nella popolazione di sesso femminile ed il trattamento di questa patologia ha subito negli ultimi anni diversi cambiamenti, sia in ambito chirurgico sia in ambito oncologico. La gestione delle pazienti affette da tumore della mammella non può prescindere oggi da un approccio multidisciplinare e spesso anche multimodale.

In tale contesto si inserisce il ruolo del trattamento sistemico neoadiuvante e quello della metodica cardine dell'ambito della medicina di precisione, ossia della biopsia liquida.

In questo studio sono stati arruolati 28 pazienti, 27 donne ed 1 uomo, con diagnosi istopatologica di carcinoma della mammella in stadio I-III sottoposti a trattamento chemioterapico neoadiuvante a secondo dell'istotipo tumorale. Sono stati raccolti i campioni di cfDNA al baseline (T0) ed in fase peri operatoria (T1) e questi dati sono stati correlati con i dati clinico-radiologici e anatomopatologici.

Sono stati ottenuti risultati significativi sul monitoraggio della cinetica del cfDNA in relazione allo stadio patologico di malattia e stadio clinico, valutato mediante mammografia e risonanza magnetica mammaria.

Il cfDNA è stato correlato anche con il raggiungimento della risposta patologica completa (pCR). Analisi per sottogruppi, in base all'istotipo, hanno sottolineato delle importanti differenze nel correlare le concentrazioni di cfDNA con il trattamento oncologico somministrato. In uno dei casi in esame, per cui erano disponibili dati di follow up, è stato evidenziato anche un possibile ruolo prognostico del cfDNA.

La biopsia liquida attualmente riveste un ruolo importante nel carcinoma della mammella in stadio avanzato ma questo studio, nonostante necessiti di ulteriori

aggiornamenti ed approfondimenti, rileva il potenziale utilizzo di questa metodica anche nel setting di malattia in stadio precoce.

# CAPITOLO I

## 1.1 Background

In Italia il carcinoma della mammella è il tumore più frequentemente diagnosticato nelle donne in tutte le fasce d'età. In particolare, si registrano le seguenti incidenze: 0-49 (41%), 50-69 (35%) +70 (22%) [1].

Il tumore della mammella è anche la patologia neoplastica con prevalenza più alta nel sesso femminile: sono 834.200 le donne viventi in Italia dopo una diagnosi di tumore della mammella [2], ovverosia il 43% di tutte le donne che convivono con una pregressa diagnosi di tumore [1]. Ciò è dovuto soprattutto al fatto che, grazie ai programmi di screening di dimostrata appropriatezza [3] ed alla crescente consapevolezza delle donne, la maggior parte dei tumori maligni mammari è diagnosticata in fase iniziale, permettendo di ottenere sopravvivenze a 5 anni molto elevate. Inoltre, nonostante nel 6-7% dei casi il tumore alla mammella si presenta metastatico già alla diagnosi. In Italia la sopravvivenza a 5 anni è dell'88%, una delle più alte registrate in Europa [2].

L'età di insorgenza del carcinoma della mammella è comunque estremamente varia, in particolare in Italia il 20% delle donne colpite da tumore al seno ha meno di 40 anni. Allo stesso tempo si registra anche un incremento di diagnosi tra le donne con età maggiore di 74 anni che rappresentano il 35% dei casi [4].

I principali fattori di rischio per l'insorgenza del tumore della mammella sono:

- *Fumo di tabacco*
- *L'età della paziente*

- *Fattori riproduttivi*
- *Fattori ormonali*
- *Fattori dietetici e metabolici*
- *Pregressa radioterapia a livello toracico*
- *Familiarità ed ereditarietà*

Attualmente, grazie alla maggior consapevolezza delle donne, ottenuta anche per mezzo delle campagne di sensibilizzazione, la diffusione dei programmi di screening ha fatto portare ad un incremento delle diagnosi di tumori mammari in fase preclinica, nella quale la neoplasia non è rilevabile attraverso la palpazione ma soltanto attraverso indagini radiologiche capaci di evidenziare lesioni estremamente piccole [5].

Tuttavia, ancora oggi, il carcinoma mammario all'esordio si presenta più tipicamente come una formazione nodulare di consistenza duro-lignea, a margini irregolari e caratterizzata da fissità rispetto ai piani superficiali e/o profondi. Quest'ultima è una caratteristica tipica delle forme tumorali maligne e indica che il tumore sia adeso alle strutture anatomiche sovrastanti (cute, derma, sottocute) o profonde (muscoli, parete toracica). Oltre alla fissità del nodulo, un'altra espressione indicativa di malignità è data dalla retrazione della cute ad esso sovrastante, che è dovuta all'invasione da parte delle cellule tumorali dei retinacula cutis, cioè dei tralci fibrosi che connettono la cute al tessuto sottocutaneo; l'infiltrazione da parte delle cellule tumorali fa sì che si realizzi una reazione sclerotica, con accorciamento dei retinacula cutis e conseguente infossamento cutaneo [5].

Oltre il 95% dei tumori maligni della mammella è rappresentato, da un punto di vista anatomico-patologico, da adenocarcinomi, i quali si suddividono in carcinomi in situ, cioè neoplasie intraepiteliali, contenute all'interno della membrana basale, e

carcinomi invasivi che oltrepassando la membrana basale infiltrano lo stroma e da qui le cellule potranno invadere i vasi raggiungendo così i linfonodi regionali e le sedi a distanza [6].

Sia i carcinomi in situ, sia quelli invasivi possono essere ulteriormente classificati come duttali e lobulari e, nonostante esista ormai l'evidenza che tutti i carcinomi della mammella originino dall'unità terminale duttulo-lobulare, l'uso di questi due termini persiste ancora. In particolare, la distinzione tra i due non è topografica ma piuttosto morfologica: con il termine "lobulare" si fa riferimento ad un tipo specifico di carcinomi, alla cui origine vi è un danno genetico che causa la perdita della molecola di adesione E-caderina, per questo le cellule tumorali non formeranno più dotti ma saranno disgregate e infiltreranno il parenchima in singole unità. Con il termine "duttale" si fa invece riferimento ad una proliferazione neoplastica formante dotti.

Ulteriori sottoclassificazioni si basano sul fenotipo neoplastico, immunoistochimico, e molecolare [7].

In particolare, la classificazione molecolare si basa sull'espressione o meno del recettore per gli estrogeni (ER), del recettore per il progesterone (PgR) e di HER2/neu.

HER2/neu è il recettore 2 per il fattore di crescita epidermico umano e appartiene alla famiglia delle proteine ErbB, cioè la famiglia dei recettori epidermici dei fattori di crescita. Circa il 30% dei carcinomi della mammella si sviluppa in concomitanza ad un'amplificazione del proto-oncogene HER2/neu o alla sovraespressione del suo prodotto proteico [8]. L'iper-espressione di questo recettore, ha un comportamento opposto a quello dei recettori ormonali, associandosi a una prognosi peggiore e ad un maggior rischio di reinsorgenza del tumore [9].

Grazie alle indagini di espressione genica è possibile classificare i carcinomi della mammella invasivi in quattro sottogruppi:

- Luminal A: (dal 40 al 55% dei carcinomi NAS) costituito dai carcinomi HR (hormon receptors) - positivi e HER2/neu-negativi. Sono per la maggior parte carcinomi ben o moderatamente differenziati e con indice di proliferazione, espresso da Ki67  $\leq 20\%$ . Epidemiologicamente si presentano per lo più nel post menopausa.
- Luminal B: (dal 15 al 20% dei carcinomi NAS) comprende tumori che esprimono HR ma, rispetto al luminal A, è in genere di grado superiore, ha un tasso proliferativo (Ki67) più alto, cioè  $>20\%$ , e spesso iperesprime HER2/neu. In questa categoria rientrano quei carcinomi chiamati anche “triplici positivi” in quanto possono essere ER-positivi, Pgr-positivi e HER2/neu-positivi. A causa dell’elevato indice proliferativo correlato all’elevata espressione dei geni di proliferazione, hanno un alto rischio di recidiva [1];
- Basal-like: caratterizzati dall’assenza dell’espressione di ER, Pgr e di HER2/neu (per tale assetto recettoriale sono anche detti tripli negativi) e per l’espressione di marcatori tipici delle cellule mioepiteliali, come citocheratine basali (ad esempio CK5/6 e CK14), P-caderina, p63 o laminina [10]. Spesso originano in donne giovani e con mutazioni del gene BRCA1. Inoltre, sono generalmente di alto grado, hanno un elevato tasso di proliferazione, sono quindi associati ad un’evoluzione aggressiva con metastasi viscerali e cerebrali frequenti e hanno una prognosi infausta;
- HER2 positivo: questo gruppo comprende carcinomi ER-negativi che iperesprimono la proteina HER2/neu, la cui iperespressione è dovuta nel 90% dei casi all’amplificazione dei segmenti di DNA su 17q21 che include il gene HER2/neu, mentre solo in rari casi l’iperespressione di questa proteina può

essere provocata da altri meccanismi oltre l'amplificazione genica [11]. Nella maggior parte di queste neoplasie vi è un'alterazione dei saggi per la valutazione di HER2/neu, che comprendono la determinazione del numero di copie geniche mediante ibridazione fluorescente in situ (FISH), del livello di mRNA tramite microarray e della proteina attraverso l'immunoistochimica [6]. In particolare, per valutare l'iperespressione di HER2 si utilizzano, in prima istanza, tecniche di immunoistochimica che restituiscono risultati classificabili come 0 (nessuna reattività o reattività di membrana in <10% delle cellule), 1+ (debole reattività di membrana in >10% delle cellule), 2+ (reattività di membrana completa, debole o moderata, in >10% delle cellule), 3+ (reattività di membrana completa e forte in >10% delle cellule). Sulla base dei suddetti risultati, il test viene giudicato negativo nei casi classificati come 0 e 1+, positivo in caso di classificazione 3+, mentre in caso di classificazione 2+, è necessario eseguire la FISH per avere più precise informazioni sul trattamento da intraprendere. Al contrario, se il gene non risulta amplificato, tale trattamento non sarà indicato.

Dal punto di vista della diagnostica strumentale, la mammografia è tutt'oggi l'esame cardine per lo studio della mammella e può essere utilizzata isolatamente o in associazione con l'esame clinico ed ecografico; consiste in una radiografia della mammella in 2 proiezioni:

- Cranio-caudale, mediante la quale si distinguono le lesioni situate nei quadranti esterni piuttosto che interni;
- Obliqua medio-laterale, mediante la quale si distinguono lesioni situate nel quadrante superiore o inferiore. Questa proiezione è importante anche perché coinvolge la componente del prolungamento ascellare della mammella, in cui

si possono evidenziare eventuali linfadenopatie, pur essendo meglio visionabili all'ecografia.

La ghiandola mammaria è costituita da tessuti che hanno di per sé un basso contrasto: tessuto adiposo e tessuto fibro-ghiandolare. Di contro la mammografia produce immagini che possiedono un alto contrasto ed un'alta risoluzione spaziale, consentendo così l'identificazione e l'esaltazione di dettagli di interesse clinico che suggeriscono la presenza del tumore al seno.

Il periodo migliore per eseguire l'esame è, in particolare, quello preovulatorio, evitando così l'acquisizione dell'immagine in un momento in cui la ghiandola mammaria sarebbe più densa e l'immagine corrispondente più complessa alla lettura da parte del radiologo.

Con l'avanzare dell'età la mammella andrà incontro ad un'involuzione adiposa, caratterizzata dalla riduzione di tessuto ghiandolare e dalla presenza di una buona quantità di tessuto adiposo. In questa situazione è possibile l'individuazione, attraverso la mammografia, di microcalcificazioni e noduli di piccole dimensioni ossia neoplasie in stadi iniziali [5].

Tramite la mammografia, la lesione mammaria può essere suddivisa secondo la classificazione BI-RADS in:

- BI-RADS 1: esame negativo;
- BI-RADS 2: lesione benigna;
- BI-RADS 3: lesione probabilmente benigna, per la quale è suggerito un follow-up a breve intervallo di tempo (6 mesi);
- BI-RADS 4: lesione sospetta, per la quale si consiglia la biopsia;
- BI-RADS 5: lesione altamente indicativa di malignità, per cui viene effettuata la biopsia ed i trattamenti necessari. In questi casi la probabilità di neoplasia è maggiore del 95%;

- BI-RADS 6: neoplasia accertata da biopsia [12].

L'ecografia permette di distinguere con elevata sicurezza la lesione cistica dalla lesione solida e per questo è stata introdotta nella diagnostica senologica come supporto alla mammografia quando venivano identificate, all'immagine mammografica, opacità non meglio caratterizzabili. Risulta essere complementare alla mammografia anche nelle donne di età superiore a 40 anni, caratterizzate da ghiandole mammarie più dense e disomogenee e in donne portatrici di protesi.

Ha il vantaggio di essere un'indagine non biologicamente dannosa, in quanto basata sugli ultrasuoni ed è quindi l'indagine di prima istanza per le donne di età inferiore ai 40 anni e per le donne in gravidanza, essendo anche utile allo studio delle cicatrici post mastectomia e nello studio delle principali stazioni linfonodali di drenaggio. Nelle donne giovani rende possibile l'osservazione di strutture ghiandolari dense, che risulterebbero difficoltose da studiare mediante esame mammografico, evidenziando nel loro contesto piccole cisti a contenuto liquido, indicative di mastopatia fibrocistica, oppure rilevando piccoli noduli [5].

Inoltre, l'ecografia permette di eseguire prelievi bioptici e citologici guidati su lesioni sospette. Tuttavia, è importante sottolineare la minore sensibilità dell'ecografia rispetto alla mammografia nell'identificare le micro-calcificazioni [14].

La risonanza magnetica grazie alle sue caratteristiche intrinseche di multiplanarietà ed elevata risoluzione di contrasto, offre un valido supporto all'imaging tradizionale della mammella e, grazie all'ausilio del mezzo di contrasto paramagnetico somministrato per via endovenosa, è possibile identificare le lesioni mammarie e caratterizzarle.

Le principali indicazioni per la risonanza magnetica mammaria sono:

- Stadiazione preoperatoria: la RM mammaria ha maggiore sensibilità, rispetto alla mammografia ed all'ecografia, nella stadiazione locale del carcinoma mammario (multifocalità, multicentricità ed eventuale bilateralità) [5,1];
- Valutazione dell'effetto della chemioterapia neoadiuvante: la RM è lo strumento migliore per la valutazione della risposta in corso e al termine della terapia neoadiuvante (NAC) e consente una stima più accurata rispetto a quanto dimostrabile con l'esame clinico e con la mammografia ed ecografia mammaria. In particolare, le dimensioni tumorali risultanti dalla misurazione mediante RM hanno dimostrato di essere meglio correlate alle dimensioni rilevate all'esame istologico [14], e inoltre essa appare la metodica migliore nella valutazione della risposta patologica completa [15];
- Diagnosi differenziale di lesioni pericicatrizziali;
- Risultati equivoci alla mammografia o all'ecografia, se non è possibile eseguire la biopsia;
- Sospetto clinico all'imaging convenzionale in donne con protesi mammarie [1,16].

La stadiazione del carcinoma della mammella segue la classificazione TNM.

Il trattamento del carcinoma della mammella si avvale di un approccio multidisciplinare e multimodale nel quale, oltre alla chirurgia, rivestono un ruolo altrettanto importante la radioterapia, la chemioterapia, l'endocrinoterapia e l'immunoterapia [5].

Il trattamento del carcinoma della mammella si può avvalere del trattamento neoadiuvante, che consta di una terapia sistemica somministrata prima della chirurgia. Il rationale dell'impiego di tale strategia terapeutica è quello di ottenere

un downstaging della neoplasia primitiva, di effettuare una valutazione prognostica sulla base della risposta patologica dopo trattamento sistemico neoadiuvante, di calibrare il trattamento post-operatorio sulla base della presenza di malattia residua dopo trattamento sistemico neoadiuvante e di ottenere un'adeguata citoriduzione a favore di una possibile successiva chirurgia in una neoplasia giudicata non suscettibile di intervento chirurgico come primo approccio terapeutico.

La scelta del tipo di trattamento sistemico neoadiuvante dipende da diversi fattori ma è effettuata principalmente sulla base del sottotipo molecolare di carcinoma mammario.

In linea generale, i regimi chemioterapici comunemente utilizzati prevedono uno schema sequenziale a base di antraciclina, ciclofosfamide e taxani. Nel sottotipo HER2+, il trattamento neoadiuvante si avvale anche dell'utilizzo degli anticorpi monoclonali anti-HER2, in associazione alla chemioterapia.

Nell'istotipo triplo negativo il trattamento sistemico neoadiuvante è stato notevolmente rivoluzionato, specialmente nel setting di malattia localmente avanzata, grazie all'impiego dell'immunoterapia in associazione alla chemioterapia. In particolare, dai risultati dello studio di fase III Keynote-522, che ha confrontato il trattamento chemioterapico standard con o senza l'aggiunta dell'agente immunoterapico Pembrolizumab, sia in fase neoadiuvane sia adiuvate, si evince come il tasso di pCR sia maggiore nel braccio di trattamento con chemioterapia associata all'immunoterapico (64,8%) rispetto al braccio di trattamento con chemioterapia e placebo (51,2%) [17].

La chirurgia conservativa del carcinoma mammario è ormai una realtà indiscutibile e fornisce la possibilità di preservare la mammella, garantendo una comprovata radicalità oncologica e offrendo un rispetto dell'aspetto estetico.

Uno dei primi approcci chirurgici è stato quello della mastectomia radicale secondo Halsted, che consisteva nell'asportazione della ghiandola mammaria con ampia parte della cute sovrastante comprendente il complesso areola-capezzolo, i muscoli pettorali grande e piccolo e i linfonodi ascellari di I, II e III livello (i linfonodi di I livello sono situati lateralmente al margine del muscolo piccolo pettorale, i linfonodi di II livello sono posti al di sotto del muscolo piccolo pettorale e i linfonodi di III livello sono localizzati medialmente al margine mediale del muscolo piccolo pettorale).

Il ruolo della chirurgia conservativa non riveste importanza soltanto nel contesto della chirurgia della mammella, ma trova applicazione anche nella gestione dei linfonodi del cavo ascellare [5].

La biopsia del linfonodo sentinella (LS) rappresenta lo standard terapeutico, secondo pratica clinica comune, per le pazienti con carcinoma mammario di stadio clinico I-II e con linfonodi clinicamente negativi o con linfonodi clinicamente sospetti ma con successivo agoaspirato negativo [1].

La dissezione ascellare (con asportazione di almeno 10 linfonodi per la valutazione patologica accurata dell'ascella) è invece indicata secondo pratica clinica comune:

- in presenza di linfonodi ascellari clinicamente patologici e confermati da studio cito-microistologico preoperatorio;
- in presenza di macrometasasi del linfonodo sentinella all'esame istologico estemporaneo;
- in casi selezionati e dopo discussione multidisciplinare in presenza di linfonodo sentinella positivo con macrometastasi all'esame istologico definitivo (e non all'esame estemporaneo);
- nel caso di mancato reperimento del linfonodo sentinella;

- nei tumori T4 e nel carcinoma infiammatorio [65].

## **1.2 Scopo dello studio e obiettivi**

Recentemente, anche nel contesto del carcinoma della mammella, sta emergendo il ruolo della biopsia liquida come strumento per identificare biomarkers, come il cfDNA, che possano predire la risposta al trattamento o fungere da indicatori precoci di progressione della patologia.

Recentemente è stato dimostrato che mutazioni a carico del gene ESR1 hanno un ruolo predittivo di resistenza al trattamento con CDK4/6 inibitori. In particolare, le mutazioni di ESR1 sono state analizzate nel ctDNA di 1017 pazienti con tumore della mammella metastatico prima e dopo un mese di trattamento con palbociclib in combinazione ad anti-aromatase come prima linea, ed è stato dimostrato che la presenza delle mutazioni riduceva significativamente la progression free survival (PFS) al trattamento (ESR1 wild type vs ESR1 mut 26.7 vs 11 mesi,  $p < 0.001$ ). Inoltre, nel gruppo di pazienti mutate (3.2%), è stato dimostrato anche che la clearance delle mutazioni di ESR1 nel ctDNA dopo un mese di trattamento predice una sopravvivenza più lunga, rispetto al gruppo di pazienti che manteneva quantità di mutazione nel ctDNA rilevabili (ESR1 mut cleared vs ESR1 mut detected 24.1 vs 7.4 mesi,  $p < 0.001$ ) (PADA-1 trial - NCT03079011) [18].

Altro scenario è quello legato all'utilizzo di alpelisib, inibitore del gene PIK3CA, approvato nel 2019 da FDA per il trattamento delle pazienti con tumore della mammella metastatico, PIK3CA-mutato. Le mutazioni di questo gene sono rintracciabili mediante biopsia tissutale ma anche attraverso la biopsia liquida [19].

Ottimizzare le metodiche per prevenire la risposta patologica alla chemioterapia neoadiuvante è essenziale per personalizzare il trattamento del cancro al seno in fase iniziale.

Questo studio si pone per tali ragioni l'obiettivo di valutare il ruolo della biopsia liquida, mediante lo studio del DNA libero circolante (cfDNA), come surrogato di risposta al trattamento chemioterapico neoadiuvante in pazienti affette da carcinoma della mammella.

Obiettivi primari sono quindi:

- valutare il ruolo del monitoraggio della cinetica del cfDNA in relazione allo stadio patologico di malattia

- valutare il ruolo del monitoraggio della cinetica del cfDNA in relazione allo stadio clinico/radiologico di malattia valutato mediante mammografia e risonanza magnetica mammaria.

Obiettivi secondari dello studio sono:

- Valutare il ruolo della biopsia liquida (cfDNA) come predittore di pCR

- Valutare la cinetica della variazione del cfDNA in relazione ai vari sottotipi di carcinoma mammario

- Valutare il ruolo del cfDNA come fattore prognostico, identificando i pazienti a più alto rischio di recidiva di carcinoma della mammella.

## CAPITOLO II

### **2.1 Materiali e Metodi**

#### **2.1.1 Selezione dei pazienti**

Il progetto di ricerca ha ricevuto l'approvazione da parte del Comitato etico 1 in data 15/02/2022 (verbale 02/2022). Sulla base dei criteri d'inclusione stabiliti, sono stati arruolati, 28 pazienti, 27 donne ed 1 uomo con diagnosi istopatologica di carcinoma della mammella di istotipo duttale, lobulare o mucinoso e con sottotipo molecolare Luminal (A e B), HER2-positivo o basal-like afferite da Aprile 2022 a Dicembre 2024 presso il reparto di Oncologia Medica del Policlinico "Paolo Giaccone" di Palermo.

Al momento dell'arruolamento è stato acquisito il consenso informato per ogni paziente incluso nello studio.

I pazienti selezionati erano affetti da tumore della mammella in stadio I-III secondo la classificazione AJCC 2017, erano Naïve per trattamenti chemioterapici, con ECOG PS  $\leq 2$  ed avevano un'età superiore a 18 anni.

Sono stati analizzati dati relativi alle indagini strumentali pre- e post-chirurgiche, ai trattamenti chemioterapici effettuati, agli accertamenti anatomopatologici ed alle procedure chirurgiche a cui le pazienti sono state sottoposte.

#### **2.1.2 Caratteristiche dei pazienti**

I dati ricavati sono stati estratti dall'analisi dei 28 pazienti selezionati in relazione all'aver intrapreso il trattamento neoadiuvante.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti in esame, ricavate dalle cartelle cliniche, sono state riportate nella seguente tabella.

PZ.	ETÀ	ISTOTIPO	G	ER%	RPg%	HER2-NEU	KI67%	SOTTOTIPO MOLECOLARE
PZ.1	61	CDI NST	3	80	NEG	NEG	10	LUMINAL
PZ.2	83	CDI	2	NEG	NEG	POS	50	HER2
PZ.3	67	CDI	2	NEG	NEG	POS	10	HER2
PZ.4	72	CDI NST	2	0	0	2+, POS	15	HER2
PZ.5	50	CDI NST	2	15	2	POS	10	HER2
PZ.6	29	CDI NST	2	>95	30	NEG	3	LUMINAL
PZ.7	63	CDI NST	2	NEG	NEG	NEG	2	TNBC
PZ.8	63	CDI NST	3	>95	90	POS	20	HER2
PZ.9	61	CLI	3	100	30	POS	25	HER2
PZ.10	54	CDI	3	0	0	NEG	50	TNBC
PZ.11	62	CDI	3	0	0	NEG	80	TNBC
PZ.12	75	CDI	3	95	50	POS	35	HER2
PZ.13	74	CDI	3	0	0	0	35	TNBC
PZ.14	49	CDI	3	0	0	0	60	TNBC
PZ.15	52	CDI	3	0	0	0	75	TNBC
PZ.16	69	CDI	3	0	0	0	30	TNBC
PZ.17	57	CDI	2	100	90	POS	25	HER2
PZ.18	53	CDI	3	8	0	POS	20	HER2
PZ.19	55	CDI	3	95	90	POS	80	HER2
PZ.20	72	CDI	3	0	0	0	65	TNBC
PZ.21	52	CDI	3	50	10	30	90	LUMINAL
PZ.22	53	CDI	3	90	80	POS	30	HER2
PZ.23	40	CDI	2	95	50	0	20	LUMINAL
PZ.24	65	CDI	3	95	5	NEG	45	LUMINAL
PZ.25	46	CDI	3	1	0	NEG	80	TNBC
PZ.26	71	CDI	3	10	5	NEG	60	LUMINAL
PZ.27	68	CDI	3	60	30	NEG	50	LUMINAL
PZ.28	53	CDI	3	0	0	NEG	70	TNBC

TABELLA 1: Caratteristiche dei 28 pazienti arruolati

### 2.1.3 Strategia terapeutica

#### ➤ **Trattamento chemioterapico neoadiuvante**

Nei pazienti affetti da carcinoma della mammella HER2-positivo il trattamento chemioterapico neoadiuvante è fortemente incoraggiato in quanto tali neoplasie, insieme ai carcinomi di sottotipo triplo negativo, sono caratterizzate da una maggiore aggressività biologica, e la loro risposta al trattamento neoadiuvante ha dimostrato risultati incoraggianti in termini di risposta patologica completa e tassi di sopravvivenza.

I regimi chemioterapici da impiegare vengono scelti in accordo al sottotipo di carcinoma mammario, in particolare nelle pazienti prese in esame sono stati adottati i seguenti schemi terapeutici:

- nelle pazienti con carcinoma mammario di sottotipo molecolare luminal (A e B) è stato seguito uno schema sequenziale a base di Epirubicina-Ciclofosfamide per 4 cicli ogni 21 giorni e, a seguire, Taxolo settimanale per 12 settimane totali;
- nelle pazienti HER2-positive sono stati impiegati sempre regimi di terza generazione (Epirubicina-Ciclofosfamide) per 4 cicli seguiti da Taxolo associato ad un agente anti-HER2, il Trastuzumab per 12 cicli con cadenza settimanale. In alcuni casi, per pazienti unfit, è stato omesso l'utilizzo dell'antraciclina.
- nelle pazienti triplo negative la terapia è stata invece basata sull'impiego dell'immunoterapia in associazione alla chemioterapia, nello specifico è stato seguito uno schema sequenziale con Pembrolizumab e Carboplatino Taxolo per 4 cicli e, a seguire, Pembrolizumab ed Epirubicina-Ciclofosfamide per altri 4 cicli.

La durata compressiva della chemioterapia neoadiuvante per ogni paziente è stata quindi di circa 6 mesi, fatta eccezione per i casi in cui non è stato possibile seguire una strategia sequenziale.

#### ➤ **Trattamento chirurgico**

Il trattamento chirurgico prevede la possibilità di effettuare mastectomia +/- linfadenectomia oppure quadrantectomia +/- linfadenectomia, anche in relazione al risultato dell'esame estemporaneo del linfonodo sentinella.

Dei 28 pazienti esaminati, 23 sono stati sottoposti ad intervento di quadrantectomia, 5 invece ad intervento di mastectomia.

La valutazione del linfonodo sentinella è stata eseguita nel 100% dei casi e la successiva linfoadenectomia totale del cavo ascellare è stata eseguita in 5 pazienti.

#### **2.1.4 Raccolta del plasma e isolamento del cfDNA**

Per i 28 pazienti arruolati nello studio sono stati raccolti i campioni di sangue periferico e, dal plasma, estratto e quantizzato il cfDNA in due timepoints, al baseline (prima del NACT, T0) ed al termine nella chemioterapia neoadiuvante cioè in fase peri-operatoria (T1).

Per ogni paziente e per ogni timepoints sono stati raccolti i campioni di sangue in quattro provette vacutainer contenenti EDTA da 3 ml e processati entro un'ora per la raccolta del plasma.

Brevemente i campioni di sangue intero vengono centrifugati a 4°C per 10 minuti a 1200g per eliminare i detriti cellulari. Il surnatante così ottenuto viene quindi nuovamente centrifugato per 10 minuti a 3000g a 4°C. Il plasma viene quindi conservato in provette criostatiche a -80°C fino al successivo utilizzo.

Il DNA circolante viene isolato utilizzando il kit QIAamp Circulating Nucleic Acid (Qiagen) secondo i protocolli del produttore per 2 mL di plasma. La procedura è composta da 4 fasi (lisi, legame, lavaggio ed eluizione).

Il DNA tumorale circolante viene eluito in 55 µL di soluzione tampone e conservato a -20°C. La quantizzazione del DNA viene eseguita utilizzando sia NanoDrop (Thermo Scientific) secondo le raccomandazioni del produttore, sia il fluorometro Qubit 2.0 (Life Technologies) con il kit di analisi dsDNA HS (High Sensitivity).

Tutte queste analisi di biopsia liquida sono condotte nel Laboratorio del professore Antonio Russo (UOC Oncologia Medica – Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Paolo Giaccone).

## CAPITOLO III

### 3.1 Risultati

Da Aprile 2022 a Dicembre 2024 sono stati arruolati 28 pazienti che afferivano presso il reparto di Oncologia Medica del Policlinico “Paolo Giaccone” di Palermo, 27 donne ed 1 uomo, affetti da tumore della mammella invasivo in stadio I-III secondo l’ 8<sup>a</sup> edizione della Classificazione AJCC 2017 ed il 100% della popolazione in esame è stato sottoposto a trattamento neoadiuvante.

Dei 28 pazienti identificate:

- 6 si presentavano in stadio clinico I;
- 19 in stadio clinico II;
- 3 in stadio clinico III;

Il 43% dei casi presi in esame avevano inoltre linfonodi francamente positivi per localizzazione di malattia già al momento della diagnosi.

Ogni paziente arruolata è stata sottoposta a prelievo ematico per la valutazione della concentrazione di *cfDNA*.

I dati relativi al sottotipo istologico, allo stadio clinico ed alla concentrazione di *cfDNA* al baseline (T0) sono riportati nella Tabella 2.

PZ.	TNM clinico al T0	STADIO CLINICO	SOTTOTIPO	[ <i>cfDNA</i> ] ng/ul
PZ.1	T2 N0	IIA	Luminal	0,6
PZ.2	T2 N0	IIA	Her2+	0,8
PZ.3	T4a N0	IIIB	Her2+	0,6
PZ.4	T2 N0	IIA	Her2+	1,3
PZ.5	T2 N0	IIA	Her2+	0,3
PZ.6	T1c N0	IB	Luminal	0,5
PZ.7	T1c N0	IB	TNBC	0,2
PZ.8	T2 N1	IIIB	Her2+	0,3
PZ.9	T2 N1	IIIB	Her2+	0,6
PZ.10	T2 N0	IIA	TNBC	0,3
PZ.11	T1 N0	IB	TNBC	0,5
PZ.12	T2 N0	IIA	Her2+	1,1
PZ.13	T1c N0	IB	TNBC	1,3

PZ.14	T2 N1	IIB	TNBC	0,7
PZ.15	T1c N0	IB	TNBC	0,88
PZ.16	T2 N1	IIB	TNBC	1,11
PZ.17	T2 N1	IIB	Her2+	0,6
PZ.18	T2 N1	IIB	Her2+	0,8
PZ.19	T1cN1	IIA	Her2+	0,22
PZ.20	T4 N1	IIIB	TNBC	0,5
PZ.21	T2 N1a	IIA	Luminal	0,34
PZ.22	T2 N0	IIA	Her2+	0,55
PZ.23	T2 N1	IIB	Luminal	0,3
PZ.24	T2N1	IIB	Luminal	0,27
PZ.25	T1b N0	IA	TNBC	0,90
PZ.26	T2 N0	IIA	Luminal	0,4
PZ.27	T3 N3	IIIB	Luminal	0,38
PZ.28	T2 N0	IIA	TNBC	1,65

TABELLA 2: Stadiazione TNM al baseline (T0) e concertazione di *cfDNA* al baseline (T0)

Al termine del trattamento chemioterapico neoadiuvante le pazienti sono state sottoposte a rivalutazione sistemica e locoregionale di malattia mediante mammografia, ecografia ed in alcuni casi anche risonanza magnetica e a nuovo prelievo ematico per la valutazione della concentrazione di *cfDNA*.

I dati relativi a questi risultati sono riportati Tabella 3.

<b>PZ.</b>	<b>SOTTOTIPO</b>	<b>TNM clinico al T0</b>	<b>TNM clinico al T1</b>	<b>[<i>cfDNA</i>] ng/ul</b>
PZ.1	Luminal	T2 N0	T2N0	0,4
PZ.2	Her2+	T2 N0	T1bN0	0,6
PZ.3	Her2+	T4a N0	T0N0	0,4
PZ.4	Her2+	T2 N0	T1cN0	0,6
PZ.5	Her2+	T2 N0	T1bN0	0,3
PZ.6	Luminal	T1c N0	T1cN0	0,2
PZ.7	TNBC	T1c N0	T1bN0	1,4
PZ.8	Her2+	T2 N1	T1bN0	0,3
PZ.9	Her2+	T2 N1	T1cN0	0,47
PZ.10	TNBC	T2 N0	T0N0	1,04
PZ.11	TNBC	T1 N0	T1aN0	0,5
PZ.12	Her2+	T2 N0	T1aN0	1,5
PZ.13	TNBC	T1c N0	T0N0	1,28
PZ.14	TNBC	T2 N1	T1bN0	0,89
PZ.15	TNBC	T1c N0	T0N0	1,02
PZ.16	TNBC	T2 N1	T1cN1	1,23
PZ.17	Her2+	T2 N1	T1cN1	0,2

PZ.18	Her2+	T2 N1	T1cN1	0,6
PZ.19	Her2+	T1cN1	T1aN0	0,29
PZ.20	TNBC	T4 N1	T3N1	0,6
PZ.21	Luminal	T2 N1a	T2N1	0,4
PZ.22	Her2+	T2 N0	T2N0	0,45
PZ.23	Luminal	T2 N1	T2N0	0,3
PZ.24	Luminal	T2N1	T1bN0	0,2
PZ.25	TNBC	T1b N0	T0N0	1,1
PZ.26	Luminal	T2 N0	T1aN0	0,2
PZ.27	Luminal	T3 N3	T2N3	0,33
PZ.28	TNBC	T2 N0	T0N0	2,0

TABELLA 3: Stadiazione TNM al baseline (T1) e concertazione di *cfDNA* al baseline (T1)

Dei 28 pazienti selezionati, 20 sono stati sottoposti a quadrantectomia e valutazione del linfonodo sentinella, 3 a quadrantectomia e linfoadenectomia ascellare, 3 a mastectomia e valutazione del linfonodo sentinella e 2 a mastectomia e linfoadenectomia ascellare.

Nell' 89% dei casi in esame è stato ottenuto un downstaging radiologico confermato poi alla valutazione istologica definitiva. Nel 28% dei pazienti arruolati è stata ottenuta una risposta patologica completa identificata come ypT0, ypN0.

Nel dettaglio si tratta del:

- 27% di pazienti con malattia HER2+
- 50 % di pazienti con malattia triplo negativa

<b>PZ.</b>	<b>SOTTOTIPO</b>	<b>TNM clinico al T0</b>	<b>[cfDNA] ng/ul al T0</b>	<b>TNM clinico al T1</b>	<b>[cfDNA] ng/ul al T1</b>	<b>TNM patologico post NACT</b>
PZ.1	Luminal	T2 N0	0,6	T2N0	0,4	ypT2, ypN0
PZ.2	Her2+	T2 N0	0,8	T1bN0	0,6	ypT0, ypN0
PZ.3	Her2+	T4a N0	0,6	T0N0	0,4	ypT0, ypN0
PZ.4	Her2+	T2 N0	1,3	T1cN0	0,6	ypT1c, ypN0
PZ.5	Her2+	T2 N0	0,3	T1bN0	0,3	ypT1a, ypN0
PZ.6	Luminal	T1c N0	0,5	T1cN0	0,2	ypT1c, ypN0
PZ.7	TNBC	T1c N0	0,2	T1bN0	1,4	ypT1a, ypN0
PZ.8	Her2+	T2 N1	0,3	T1bN0	0,3	ypT1b, ypN1a
PZ.9	Her2+	T2 N1	0,6	T1cN0	0,47	ypT1b, ypN0

PZ.10	TNBC	T2 N0	0,3	T0N0	1,04	ypT0, ypN0
PZ.11	TNBC	T1 N0	0,5	T1aN0	0,5	ypT1a, ypN0
PZ.12	Her2+	T2 N0	1,1	T1aN0	1,5	ypT0, ypN0
PZ.13	TNBC	T1c N0	1,3	T0N0	1,28	ypT0, ypN0
PZ.14	TNBC	T2 N1	0,7	T1bN0	0,89	ypT1a, ypN0
PZ.15	TNBC	T1c N0	0,88	T0N0	1,02	ypT1b, ypN0
PZ.16	TNBC	T2 N1	1,11	T1cN1	1,23	ypT1c, ypN1a
PZ.17	Her2+	T2 N1	0,6	T1cN1	0,2	ypT1c, ypN0
PZ.18	Her2+	T2 N1	0,8	T1cN1	0,6	ypT1b, ypN1a
PZ.19	Her2+	T1cN1	0,22	T1aN0	0,29	ypT0, ypN0
PZ.20	TNBC	T4 N1	0,5	T3N1	0,6	ypT3, ypN1
PZ.21	Luminal	T2 N1a	0,34	T2N1	0,4	ypT2, ypN1
PZ.22	Her2+	T2 N0	0,55	T2N0	0,45	ypT1a, ypN0
PZ.23	Luminal	T2 N1	0,3	T2N0	0,3	ypT2, ypN0
PZ.24	Luminal	T2N1	0,27	T1bN0	0,2	ypT1b, ypN0
PZ.25	TNBC	T1b N0	0,90	T0N0	1,1	ypT0, ypN0
PZ.26	Luminal	T2 N0	0,4	T1aN0	0,2	ypT1a, ypN0
PZ.27	Luminal	T3 N3	0,38	T2N3	0,33	ypT2, pN3a
PZ.28	TNBC	T2 N0	1,65	T0N0	2,0	ypT0, ypN0

TABELLA 3: Stadiazione TNM e concertazione di cfDNA prima e dopo il trattamento chemioterapico neoadiuvante.

Da questi dati si può desumere che al baseline (T0) la media di concentrazione di cfDNA è rispettivamente:

- sottogruppo Luminal è 0,37 ng/ul [0,27 -0,6 ng/ul]
- sottogruppo Her2+ è 0,65 ng/ul [0,22 -1,3 ng/ul]
- sottogruppo TNBC è 0,80 ng/ul [0,2 - 1,65 ng/ul]

La media di concentrazione al termine del trattamento neoadiuvante (T1) è:

- sottogruppo Luminal: 0,26 ng/ul [0,2 -0,4 ng/ul]
- sottogruppo Her2+: 0,51 ng/ul [0,2 -0,6 ng/ul]
- sottogruppo TNBC: 1,08 ng/ul [0,6-2,0 ng/ul]

Nella quasi totalità dei casi il dato di cfDNA è concorde con il downstaging clinico/radiologico ed istopatologico: vi è una riduzione media delle concentrazioni di

cfDNA dopo il termine del trattamento chemioterapico neoadiuvante, ovvero in prossimità dell'intervento chirurgico, nella maggior parte dei pazienti con malattia Luminal ed Her 2+

Nel dettaglio nel sottogruppo Luminal, rappresentato da 6 pazienti, si nota una riduzione e/o stabilità della concentrazione di cfDNA nella totalità dei casi analizzati così come un downstaging di malattia.

Nel sottogruppo HER2+, rappresentato da 11 pazienti, i risultati evidenziano che il dato riduzione/stabilità della concentrazione di cfDNA con il downstaging è valutabile nell'82% dei casi. Si distinguono due casi infatti in cui:

- paziente 12 e paziente 19: la concentrazione di cfDNA al T1 è maggiore rispetto al T0 nonostante si sia ottenuta una risposta patologica completa.

Nel sottogruppo dei pazienti con istotipo triplo negativo, l'analisi delle concentrazioni di cfDNA ha permesso di evidenziare come la concentrazione al T1, ossia in prossimità dell'intervento chirurgico, abbia una trend incrementale, nonostante l'ottenimento di un downstaging e/o di una risposta patologica completa.

Questo risultato è valutabile in 8 dei 10 pazienti appartenenti a questo sottogruppo, si distinguono:

- paziente 11: la concentrazione di cfDNA non varia nonostante il downstaging
- paziente 13: la concentrazione di cfDNA subisce una lieve riduzione ed il dato istopatologico mostra una risposta patologica completa.

L'analisi dei dati ottenuti correlata con le informazioni cliniche ha permesso di evidenziare un risultato utile nel comprendere se sia possibile conferire alle variazioni di concentrazione di cfDNA un ruolo come fattore prognostico, identificando i pazienti a più alto rischio di recidiva di malattia. Si tratta del caso

identificato come PZ 19 con malattia HER2+ e sottoposta a trattamento chemioterapico neoadiuvante sequenziale (Epirubicina–Ciclofosfamide per 4 cicli, seguiti da 12 somministrazioni di Taxolo-Trastuzumab). In questo caso si è assistito ad un lieve incremento della concentrazione di cfDNA nonostante una risposta clinico/radiologica ed il raggiungimento della risposta patologica completa alla resezione. Un follow-up più lungo di questo caso ha evidenziato una recidiva viscerale precoce per comparsa di secondarismi epatici sottoposti a tipizzazione per cui è stato intrapreso trattamento di I linea. Nonostante l'esiguità del campione questo caso è emblematico nella definizione dei molteplici ruoli della biopsia liquida.

## CAPITOLO IV

### 4.1 Discussione

La biopsia liquida è un test analitico che rispecchia gli obiettivi della medicina di precisione poiché, facendo riferimento prelievo ed analisi di fluidi biologici utilizzati come surrogato al tessuto neoplastico, consente di ottenere in maniera non invasiva, a basso costo e ripetibili informazioni utili ai fini diagnostici, prognostici e/o predittivi di risposta alla terapia [20].

Uno dei fluidi maggiormente utilizzato è il sangue che contiene materiale biologico di derivazione tumorale: marcatori proteici, cellule tumorali circolanti (CTC), acidi nucleici circolanti (DNA tumorale circolante, RNA e microRNA circolanti) e vescicole extracellulari (esosomi e microvescicole) [21].

Questa metodica si è dimostrata efficace nella comprensione dell'eterogeneità tumorale: anche se generalmente i tumori originano da un singolo clone cellulare, nel corso della loro evoluzione possono acquisire nuove alterazioni molecolari, che sarebbero difficilmente caratterizzabili mediante biopsia tissutale, essendo quest'ultima un'indagine limitata nel tempo e nello spazio, in quanto analizza solo piccole porzioni di tessuto tumorale [22-23]. Nonostante i molteplici vantaggi propri della biopsia liquida questa metodica presenta alcuni limiti legati a ciò che si analizza, alla metodica che si può utilizzare ed alla eterogeneità tumorale.

In questo studio è stato preso in esame come biomarcatore il cfDNA, rilasciato sia dalle cellule sane sia da quelle tumorali attraverso i processi di necrosi e apoptosi. La dimensione tumorale, la stadiazione TNM, la presenza di metastasi ed i trattamenti sistemici e chirurgici hanno un impatto sulla quantità di cfDNA e per

tale motivo esso può essere considerato come un biomarker surrogato di risposta al trattamento [24].

Le metodiche più comunemente utilizzate per analizzare il cfDNA sono: la PCR (Polymerase Chain Reaction, Reazione a Catena della Polimerasi) quantitativa (qPCR), la PCR digitale (dPCR) e la Next Generation Sequencing (NGS).

La biopsia liquida è quindi una tecnica diagnostica non invasiva che sta rivoluzionando l'oncologia, incluso il tumore della mammella le cui applicazioni sono già in uso per i casi di malattia avanzata in particolare per le mutazioni ESR1 e PIK3CA [18-19].

In diversi studi si è cercato di esplorare il ruolo della biopsia liquida, anche in associazione ad altre metodiche in particolare indagini strumentali, nel setting di malattia in stadio precoce. Uno di questi studi è quello condotto da Janssen et al. [25] i cui risultati suggeriscono che incorporare la biopsia liquida in un modello di previsione clinico-radiologica è informativo sulla risposta al trattamento neoadiuvante.

In particolare, è stato riscontrato come il monitoraggio di alcuni biomarcatori mediante biopsia liquida, prima, durante e dopo il trattamento possa spesso associarsi al riscontro di pCR. In questo studio, la maggior parte delle informazioni predittive provenienti dalle biopsie liquide sembravano provenire dalla quantità totale di cfDNA e dai marcatori di metilazione. Nello specifico un aumento della metilazione di AKR1B1, HIST1H3C o TM6SF1 durante il trattamento è risultato correlato con un Residual Cancer Burden (RCB) più elevato.

Lo studio di Magbanua et al. [26] invece ha suggerito che il functional tumor volume (FTV) valutato mediante risonanza magnetica e il ctDNA sono misure correlate del carico tumorale nei pazienti inclusi nello studio I-SPY 2 TRIAL

(NCT01042379). I risultati dello studio hanno mostrato un aumento dell'area sotto la curva aggiungendo ctDNA a un modello FTV derivato dalla risonanza magnetica dopo 3 settimane di terapia a base di paclitaxel, ma l'aumento non ha raggiunto la significatività statistica. Le dimensioni del campione dello studio hanno consentito solo osservazioni di grandi effetti. Il functional tumor volume (FTV) e il ctDNA sono rimasti entrambi predittori significativi della sopravvivenza libera da recidiva a distanza in un'analisi multivariata esplorativa.

Partendo da questi dati, in questo studio abbiamo voluto esplorare come la cinetica del cfDNA vari in relazione al timepoint analizzato, ai trattamenti oncologici somministrati, all'istotipo e come questi dati si correlino con le risposte clinico radiologiche ed anatomopatologiche.

I risultati hanno mostrato come nell' 89% dei casi in esame è stato ottenuto un downstaging radiologico confermato poi alla valutazione istologica definitiva, mentre la risposta patologica completa, identificata come ypT0, ypN0, è stata raggiunta nel 28% dei pazienti arruolati che avevano una malattia HER2+ o triplo negativa.

Nella quasi totalità dei casi il dato di cfDNA è concorde con il downstaging clinico/radiologico ed istopatologico, specialmente nelle pazienti con malattia luminale ed Her2+.

Studi su sottotipi HER2+ e luminali suggeriscono che il ctDNA può predire la pCR meglio delle sole imaging; nel lavoro di Garcia-Murillas [27] è stato dimostrato che in pazienti con malattia HER2+, la riduzione precoce del ctDNA è significativamente associata al raggiungimento della pCR e che i pazienti che mantengono elevati livelli di ctDNA rilevabile dopo 3-4 cicli di terapia hanno una più bassa probabilità di avere una risposta patologica completa.

I tumori della mammella luminali sono meno sensibili alla chemioterapia rispetto ad altri sottotipi molecolari (TNBC e HER2+), per vari motivi biologici (basso Ki-67, dipendenza ormonale, microambiente tumorale “freddo”). Il tasso di pCR nei tumori luminali trattati con NAC è generalmente <10–15%, rispetto al 30–40% nei HER2+ ed al 40–50% nei TNBC [28].

Nei tumori Her2+ invece l'utilizzo di farmaci che bloccano la segnalazione del recettore HER2, inibisce la proliferazione tumorale e induce l'apoptosi. Questo porta, in un primo momento ad un rilascio transitorio di acidi nucleici, seguito da una clearance progressiva [29].

Nel sottogruppo di pazienti con malattia triplo negativa i dati elaborati in questo studio sono concordi con quelli già presenti in letteratura rispetto al downstaging clinico-strumentale ed al raggiungimento della pCR. I risultati dello studio KEYNOTE-522 hanno di recente rivoluzionato la pratica clinica in questo contesto [17].

Per quanto concerne la valutazione delle concentrazioni di cfDNA i dati di questo studio mostrano un incremento durante il trattamento neoadiuvante e questo fenomeno è correlato al trattamento somministrato; infatti, mentre i trattamenti chemioterapici determinano un effetto citotossico diretto sulle cellule tumorali causando una lisi cellulare, l'immunoterapia agisce determinando una risposta immuno-mediata mediante l'attivazione immunitaria con conseguente infiltrazione delle cellule T.

La chemioterapia e l'infiammazione immuno-mediata causano danno anche a cellule sane, contribuendo all'aumento del cfDNA totale.

Il timing di questi due meccanismi sono però differenti, infatti, l'immunoterapia può indurre una risposta ritardata rispetto alla chemioterapia poiché il sistema immunitario può impiegare settimane per infiltrare, attivarsi e uccidere le cellule tumorali. Di

conseguenza, la riduzione del cfDNA può essere più lenta e graduale, anche nei pazienti che rispondono al trattamento [30].

## **4.2 Prospettive future**

Il trattamento neoadiuvante delle pazienti affette da carcinoma della mammella è in continua evoluzione e si è affermato come strategia cruciale per la gestione dei casi di malattia localmente avanzata o con sottotipi molecolari aggressivi. Ciò necessita di un approccio sempre più personalizzato e multidisciplinare ed in questo contesto, l'utilizzo della biopsia liquida per il monitoraggio di biomarcatori come il cfDNA, risulta essere uno strumento promettente.

L'importanza di tale ruolo è giustificata dal fatto che, con l'avvento di nuovi trattamenti basati su farmaci che agiscono seguendo meccanismi molecolari specifici o servendosi del sistema immunitario, occorre ampliare le possibilità di studio delle caratteristiche del tumore e dell'efficacia di questi trattamenti. In particolare, la valutazione delle variazioni di concentrazione di biomarcatori nei biofluidi potrebbe essere utilizzata nella pratica clinica come un nuovo e interessante biomarcatore per valutare l'andamento della malattia.

I dati analizzati suggeriscono come l'analisi quantitativa di cfDNA o di altri marcatori anche in associazione a modelli di previsione clinico-radiologica sia informativa sulla pCR dopo trattamento neoadiuvante.

I dati presenti in letteratura e quelli derivanti da questo studio indicano che la quantificazione del cfDNA (ctDNA) può riflettere in tempo reale la cinetica tumorale durante il trattamento. In particolare, la clearance del ctDNA durante la terapia neoadiuvante è stata associata a una maggiore probabilità di risposta

patologica completa (pCR), suggerendo il suo potenziale valore predittivo nei tumori HER2+ e triplo negativi.

Il cfDNA rappresenta quindi una delle frontiere più promettenti della medicina di precisione nel carcinoma della mammella e l'evoluzione tecnologica, con l'introduzione di metodiche sempre più sensibili e specifiche, renderà questo biomarcatore uno strumento sempre più accessibile e affidabile nella pratica clinica.

## BIBLIOGRAFIA

1. AIOM. Linee guida neoplasie della mammella; 2023.
2. AIOM-AIRTUM. I numeri del cancro in Italia; 2023.
3. Paci E, Broeders M, Hofvind S, Puliti D, Duffy SW; EUROSCREEN Working Group. European breast cancer service screening outcomes: a first balance sheet of the benefits and harms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014
4. Russo A, Boldrini M, Gandolfo N, et al.; CURA.R.T.E. 1° Convegno di Fondazione IncontraDonna, Roma, 14 giugno 2023.
5. Dionigi R., Cabitza P., Carcano G., Castelli P., Castelnuovo P., Dionigi G., Locatelli D., Parigi G. B., Rigatti P., Stella A., Valdatta L. “Chirurgia. Basi teoriche e chirurgia generale”. Edra. Sesta edizione; 2017.
6. Robbins S.L., Cotran R.S., Kumar V., Abbas A.K., “Le basi patologiche delle malattie”. Edra-Masson. Ottava edizione; 2012.
7. Rubin R., Strayer D.S., Rubin E., “Anatomia patologica, patologia d’organo e molecolare”, Piccin; 2014.
8. DJ Slamon, W Godolphin, LA Jones, JA Holt, SG Wong, DE Keith, WJ Levin, SG Stuart, J Udove, A Ullrich and, al. et; Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer *Science* 12 May 1989
9. R. Kaufmann, P. Müller, G. Hildenbrand, M. Hausmann e C. Cremer, Analysis of Her2/neu membrane protein clusters in different types of breast cancer cells using localization microscopy: ANALYSIS OF HER2/neu MEMBRANE PROTEIN CLUSTERS, in *Journal of Microscopy*, vol. 242, n. 1
10. Kang SP, et al.: Triple negative breast cancer: current understanding of biology and treatment options. *Curr Opin Obstet Gynecol* 20:40, 2008.

11. Bempt IV, et al.: The complexity of genotypic alterations underlying HER2-positive breast cancer: an explanation for its clinical heterogeneity. *Curr Opin Oncol* 19:552, 2007.
12. Balleyguier C, Ayadi S, Van Nguyen K, Vanel D, Dromain C, Sigal R. BIRADS classification in mammography. *Eur J Radiol.* 2007 Feb;61(2):192-4
13. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.*2017;67(4):290-303.
14. Marinovich MI, Macaskill P, Irwig L, et al. Agreement between MRI and pathologic breast tumor size after neoadjuvant chemotherapy, and comparison with alternative tests: individual patient data meta-analysis. *BC Cancer.* 2015
15. Gu YL, Pan SM, Ren J, et al. Role of magnetic resonance imaging in detection of pathologic complete remission in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy: A meta-analysis. *Clin Breast Cancer.* 2017;17(4):245-55.
16. Sardanelli F, Boetes C, Borisch B et al. Magnetic resonance imaging of the breast: recommendations from the EUSOMA working group. *Eur J Cancer*
17. Schmid P, Cortes J, Puztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, Denkert C, et al.; KEYNOTE-522 Investigators. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2020 Feb 27;382(9):810-821.
18. Bidard FC, Hardy-Bessard AC, Dalenc F, et al. Switch to fulvestrant and palbociclib versus no switch in advanced breast cancer with rising ESR1 mutation during aromatase inhibitor and palbociclib therapy (PADA-1): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol.*
19. André 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):208-217.

20. Russo A, Incorvaia L, Del Re M, et al. The molecular profiling of solid tumors by liquid biopsy: a position paper of the AIOM-SIAPEC-IAP-SIBioC-SIC-SIF Italian Scientific Societies published online ahead of print, 2021, *ESMO Open*.

21. Leto G, Incorvaia L, Flandina C, et al. Clinical impact of cystatin C/cathepsin L and follistatin/activin A systems in breast cancer progression: a preliminary report. *Cancer Invest.* 2016; 34(9):415–23.

22. Rolfo C, Castiglia M, Hong D, et al. Liquid biopsies in lung cancer: the new ambrosia of researchers. *Biochim Biophys Acta.* 1846;2014:539–46.

23. McGranahan N, Swanton C. Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future. *Cell.* 2017;168:613–28.

24. Russo A, Giordano A, et al. Liquid biopsy in cancer patients: the hand lens to investigate tumor evolution. *Current Clinical Pathology*, Springer 2017.

25. Janssen, L. M., Suelmann, B. B. M., Elias, S. G., Janse, M. H. A., van Diest, P. J., van der Wall, E., & Gilhuijs, K. G. A. (2022). Improving prediction of response to neoadjuvant treatment in patients with breast cancer by combining liquid biopsies with multiparametric MRI: protocol of the LIMA study - a multicentre prospective observational cohort study. *BMJ open*, 12(9).

26. Magbanua MJM, Swigart LB, Wu HT, et al. Circulating tumor DNA in neoadjuvant-treated breast cancer reflects response and survival. *Ann Oncol.* 2021;32(2):229-239. doi: 10.1016/j.annonc.2020.11.007

27. Garcia-Murillas I, Chopra N, Comino-Méndez I, et al. Assessment of Molecular Relapse Detection in Early-Stage Breast Cancer [published correction appears in *JAMA Oncol.* 2020 Jan 1;6(1):162. doi:

- 10.1001/jamaoncol.2019.6325.]. JAMA Oncol. 2019;5(10):1473-1478.  
doi:10.1001/jamaoncol.2019.1838
28. Magbanua MJM, Brown Swigart L, Ahmed Z, et al. Clinical significance and biology of circulating tumor DNA in high-risk early-stage HER2-negative breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Cell*. 2023;41(6):1091-1102.e4. doi:10.1016/j.ccell.2023.04.008
29. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med*. 2015;7(302):302ra133. doi:10.1126/scitranslmed.aab0021
30. Sanz-Garcia E, Zhao E, Bratman SV, Siu LL. Monitoring and adapting cancer treatment using circulating tumor DNA kinetics: Current research, opportunities, and challenges. *Sci Adv*. 2022;8(4):eabi8618. doi:10.1126/sciadv.abi8618