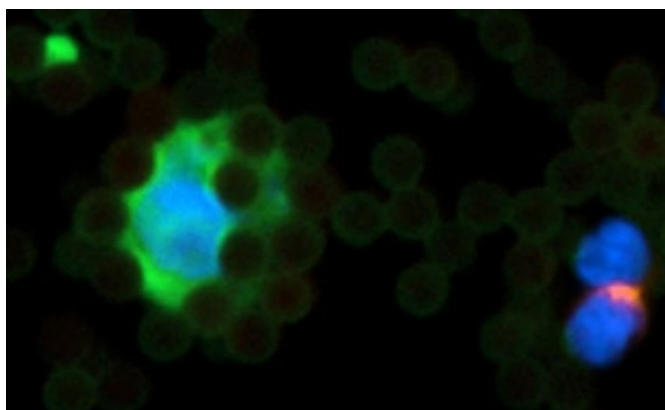


# “La biopsia liquida nel carcinoma della mammella operabile”

Responsabile Scientifico: Prof. Antonio Rulli



Cellule tumorali circolanti (CTC) isolate in pazienti con neoplasia mammaria precoce da un semplice prelievo di sangue periferico.

Estrazione e sequenziamento del DNA libero circolante (cfDNA) e DNA delle CTC (ctcDNA).

Presupposto della terapia personalizzata nel carcinoma della mammella operabile.

Presso la Sezione di Chirurgia Oncologica della Mammella e dei Tessuti Molli dell'Università di Perugia, in collaborazione con il Laboratorio del Dipartimento di Medicina Sperimentale dell'Università di Perugia ed il Laboratorio di Biologia Molecolare della S.C. di Oncologia Medica dell'Azienda Ospedaliera di Perugia è stato realizzato il Progetto di Ricerca “La prevenzione del III millennio: la Biopsia Liquida”, finanziato dalla Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori.

Purtroppo il tumore della mammella è diventato il tumore più frequente in Italia (52.800 nuovi casi per il 2018) superando gli altri due “*big Killer*” come il colon ed il polmone.

Inoltre se teniamo conto dell'età della paziente, le percentuali d'incidenza tendono a modificarsi, infatti nel gruppo delle più giovani (<50 anni) il carcinoma della mammella costituisce il **41%** dei tumori incidenti (**fascia fuori screening**).

Noi siamo molto orgogliosi che a 5 anni la sopravvivenza raggiunge, nel nostro Paese, l'87% dei casi trattati, ma siamo molto preoccupati per un 30% che a 10-15 anni non supera la malattia. Secondo i dati dell'ISTAT (2014), sono 12.201 le donne morte di cancro della mammella in Italia in un anno.

La LILT nel 2022 festeggerà i 100 anni della sua attività ed ha finanziato questo progetto per far sì che ci si avvicini sempre più all'obiettivo finale: mortalità zero.

**La prima causa di morte nei pazienti oncologici è rappresentata dalla diffusione metastatica del tumore a partire dal sito primario.**

Comprendere i meccanismi che portano la cellula tumorale primitiva a trasformarsi in una cellula tumorale a capacità metastatica è fondamentale affinché si possa bloccare il processo di invasione tumorale e formazione delle metastasi a distanza.

Il tumore è un *moving target*, cioè un bersaglio in continua evoluzione, tale da non poter essere effettivamente compreso nella sua complessità biologica dalle metodiche attualmente in uso. Infatti, ad oggi, la caratterizzazione bio-patologica del tumore è affidata ad esami istologici eseguiti su tessuti prelevati dal tumore stesso tramite biopsia o intervento chirurgico che però forniscono una fotografia istantanea della neoplasia, limitata al sito di prelievo e al momento del prelievo.

La biopsia liquida, basandosi sull'identificazione delle **CTC** (Cellule Tumorali Circolanti) nel sangue, sul **sequenziamento** del DNA tumorale estratto dalle stesse CTC (**ctcDNA**) e sul DNA libero circolante (**cell-free DNA, cfDNA**), consentirebbe di conoscere in tempo reale il profilo genetico sia della lesione primaria che delle eventuali metastasi.

Il potenziale della metodica è veramente importante perché il riscontro della CTC nella circolazione sanguigna delle pazienti anni prima dell'inizio della malattia metastatica, consentirebbe di utilizzare la biopsia liquida come una valida metodica di diagnosi precoce, di monitoraggio non invasivo della sensibilità o resistenza alla terapia e di permettere la selezione delle pazienti che necessitano di una precoce terapia sistemica.

**Le CTC sono estremamente rare:** si considera circa **una CTC per 10<sup>6</sup> cellule nucleate del sangue** (PMN, linfociti etc.) nelle pazienti in stadio metastatico <sup>[30]</sup>, **rendendo impossibile la loro identificazione con le metodiche standard di imaging ad alta risoluzione.**

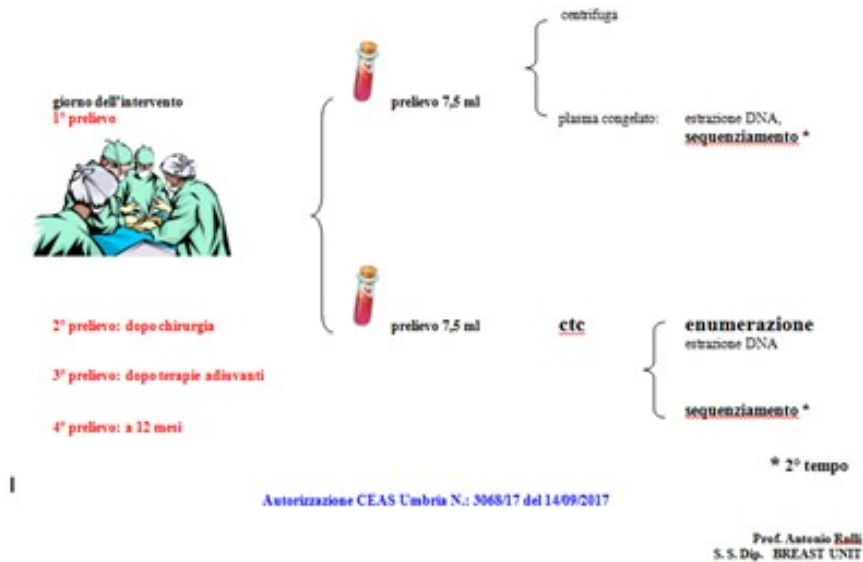
Quindi è stato necessario mettere a punto tecniche avanzate in grado di isolare e riconoscere con accuratezza e riproducibilità statistiche queste cellule tumorali occulte.

## **LO STUDIO**

Dall'aprile del 2018, 40 pazienti con **Early Breast Cancer** (36 con neoplasia e 4 controlli sani) sono state sottoposte, prima dell'intervento chirurgico, a triplice prelievo ematico periferico: due utilizzando provette specifiche (BD Vacutainer® K2 EDTA Tubes 7.5 mL) per l'isolamento, l'enumerazione delle CTC e l'estrazione del ctcDNA, il terzo prelievo è stato raccolto in altre provette (Qiagen, PAXgene Tube) per l'estrazione del cfDNA. Il ctcDNA e il cfDNA è stato sottoposto a successivo sequenziamento con tecnologia next generation sequencing (NGS) utilizzando la piattaforma ILLUMINA.

I prelievi saranno ripetuti dopo la chirurgia, dopo la terapia adiuvante e a 12 mesi dalla data dell'intervento chirurgico.

**Progetto di Ricerca: "La prevenzione del III millennio, la biopsia liquida "**



**RISULTATI RAGGIUNTI**

La percentuale di CTC isolata dal nostro studio è stata del 24,8%, in linea con i dati della letteratura internazionale (18-30).

**CTC:** Otto pazienti sono risultate positive alle CTC (cut-off 3).

Quattro, dopo la chirurgia si sono normalizzate:

0008/A	pre operatorio	20	post operatorio	0
0013/A		10		1
0014/A		7		0
0005/A		6		1

Quattro hanno continuato a presentare CTC:

0029/A	pre operatorio	7	post operatorio	3
0006/A		7		4
0017/A		3		3
0026/A		3		3

**cfDNA:** quantità isolata in rapporto a stadio di malattia:

0001/A	2,83 (avanzato)	0003/A	0,06 (iniziale)
0002/A	40,31	0004/A	0,09

**sequenziamento cfDNA:** varianti individuate nei geni:  
APC, PIK3CA, ALK, DNMT3A, KRAS, NRAS, TSC1,

**sequenziamento ctcDNA:** varianti individuate nei geni:  
CTNNB1, RET, CDKHZA, FBXW7, TP53, KRAS, NRAS, IDH1, ALK.

## CONSIDERAZIONI

Il DNA tumorale circolante (ctDNA) può essere distinto dal DNA libero circolante (cfDNA) in quanto il primo presenta le aberrazioni genetiche ed epigenetiche tumore-specifiche <sup>[51-52]</sup>. È bene considerare che il **ctcDNA è rappresentato da DNA tumorale** che viene rilasciato in circolo in seguito a necrosi od apoptosi delle stesse CTC e che quindi può anche essere ottenuto dopo lisi ed estrazione dalla stessa CTC isolata in laboratorio; mentre il **cfDNA è costituito da materiale genetico presente nel torrente ematico ma che non è necessariamente di origine tumorale, potendo essere rilasciato anche da cellule non neoplastiche.**

La presenza di DNA libero circolante nel plasma è ormai conoscenza assodata. Frammenti di DNA vengono costantemente riversati nel torrente ematico in seguito ai processi di morte cellulare, ma normalmente i livelli di cfDNA sono mantenuti molto bassi grazie all'azione di clearance esercitata da fegato, reni e milza.

Nei pazienti oncologici, invece, la concentrazione di cfDNA è significativamente più alta in relazione al fatto che la massa tumorale, a differenza di un tessuto sano, è caratterizzata da un più alto turn-over cellulare e da un maggiore numero di eventi necrotici <sup>[51]</sup>. In media si calcola una concentrazione di cfDNA nel paziente con neoplasia solida 3-4 volte superiore alla norma:

0002/A	avanzato	40,31
--------	----------	-------

0019/A	iniziale	0,05
--------	----------	------

I risultati preliminari del sequenziamento NGS, hanno mostrato che il ctcDNA, isolato dalle CTC, presenta alcune mutazioni nei geni ALK, NRAS, KRAS, che si ritrovano anche nel cfDNA.

La quota di cfDNA riversato nel circolo ematico è strettamente dipendente dalla sede, dal diametro, dal tipo di vascolarizzazione del tumore, questo determina un'importante variabilità interindividuale nei pazienti oncologici <sup>[53]</sup>.

Già dai primi studi è emerso che esiste una correlazione di tipo quantitativo tra la concentrazione di cfDNA e la massa tumorale, con corrispettive oscillazioni dei livelli di cfDNA in relazione alla risposta o meno alla terapia <sup>[53]</sup>.

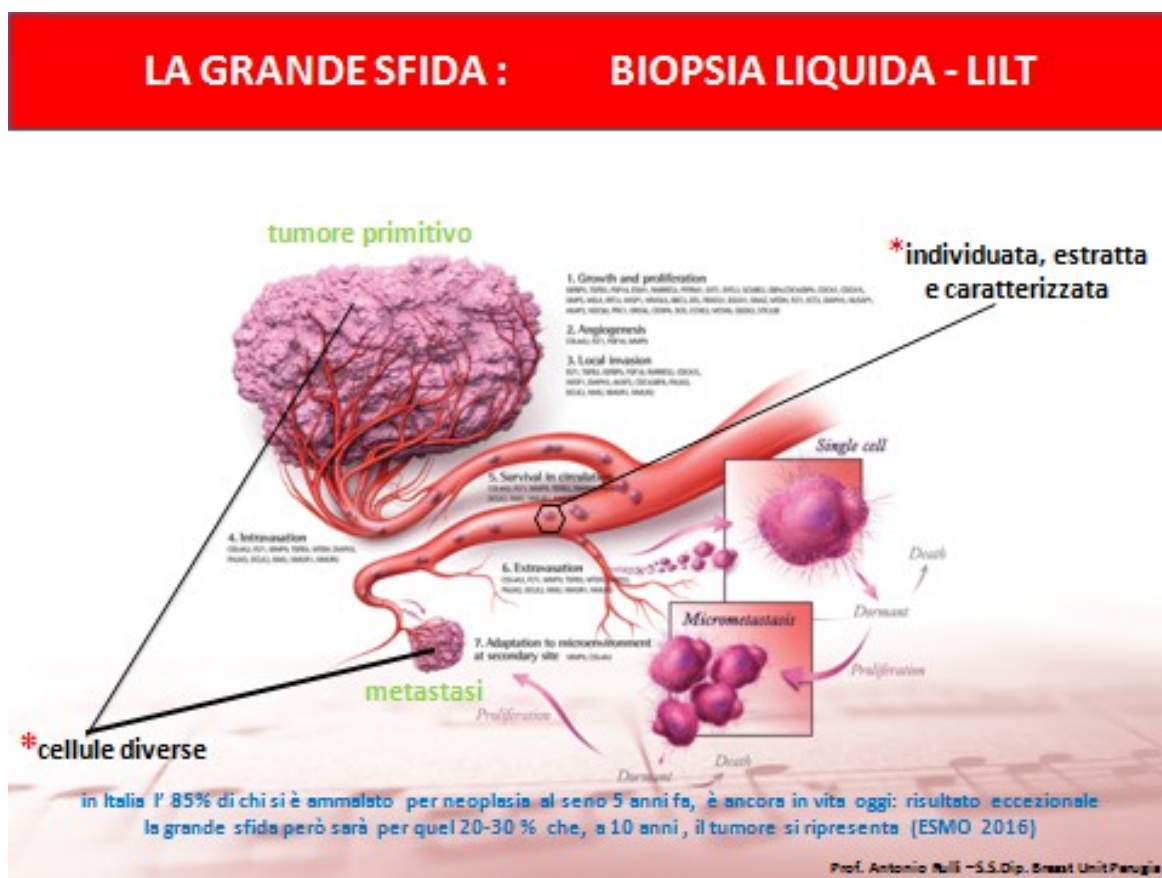
Gli studi condotti da Allard, Cristofanilli, De Bono e Cohen <sup>[56-63]</sup> hanno dimostrato che il numero delle CTC è da considerarsi come fattore prognostico indipendente in termini di sopravvivenza libera da progressione (PFS) e sopravvivenza globale (OS). Dall'analisi multivariata <sup>(57, 64)</sup> che comprende diametro tumorale, stato linfonodale, grading istologico e caratterizzazione biopatologica del tumore, risulta che **il numero delle CTC è da considerarsi un fattore prognostico indipendente per la sopravvivenza libera da malattia, la sopravvivenza libera da recidiva di malattia, la sopravvivenza cancro-specifica e la sopravvivenza globale.** Lo studio ha inoltre messo in evidenza che il ruolo prognostico delle CTC varia a seconda del sottogruppo di pazienti che si va a valutare.

Infatti per le pazienti definite a basso rischio, perché affette da neoplasia diagnosticata in stadio molto precoce (T1N0), il ruolo delle CTC sulla prognosi è meno rilevante e il trattamento di successo è indipendente rispetto al numero delle CTC presenti in circolo.

Tutt'altro è il ruolo delle CTC nelle pazienti considerate ad alto rischio con neoplasia in stadio più avanzato, dove l'enumerazione delle CTC potrebbe essere dirimente nelle scelte terapeutiche.

La definizione di un cut-off numerico di CTC che corredi con il loro ruolo prognostico non è stato ancora definito con certezza per le pazienti con Early Breast Cancer. Infatti se per le pazienti con neoplasia in stadio metastatico, gli studi precedenti avevano individuato il numero di 5 CTC come cut-off statisticamente rilevante<sup>[64]</sup>, per le pazienti in stadio precoce sembrerebbe che già il riscontro di almeno 1 CTC possa condizionarne l'outcome.

Noi, utilizzando una strumentazione molto più sensibile (Isoflux) che potrebbe anche isolare le cellule che hanno subito la trasformazione epitelio-mesenchimale (Epithelial-mesenchymal transition, EMT). Abbiamo per adesso, considerato un cut off di 3 CTC.



Le CTC sono state definite come markers “*predittori silenziosi di metastasi*”, a significare che il riscontro di CTC nel sangue di un paziente oncologico vada ad identificare indiscutibilmente un processo di metastatizzazione già in atto, prima ancora che qualsiasi altra metodica di imaging, oggi disponibile, sia in grado di identificare la lesione neoplastica clonale a distanza.

Inoltre la mancata negativizzazione del numero delle CTC dopo chirurgia può significare che sono presenti focolai micrometastatici a distanza. Al contrario la scomparsa di CTC dopo l'intervento chirurgico può significare che la malattia sia stata probabilmente debellata.

L'analisi mediante sequenziamento NGS del cfDNA e del ctcDNA sembrerebbe ad oggi utile per comprendere l'eterogeneità e complessità del tumore dal punto di vista genetico.

Le mutazioni riscontrate sono state individuate nei seguenti geni:

- gene RET** endocrino resistenza in pazienti R+ (insuccesso della terapia ormonale)  
0002/A, R+.  
RET: c.2753T>C, p.M918T, AF 0,11%, COSM965 (ctcDNA)
- gene CTNNB1** maggiore attività metastatica in pazienti basal (triplo negativo), coinvolgimento nella transizione epitelio-mesenchimale associata alle metastasi  
0001/A, basal.  
CTNNB1: c.122C>T, p.T41I, AF 0,705%, COSM5676 (ctcDNA)
- gene PIK3CA** minore sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza globale, attività inferiore del trastuzumab in paziente HER2+  
0022/A, LA  
PIK3CA, c.277C>T, p.R93W AF 1.04%, COSM27493 (cfDNA)
- gene APC** espressione diminuita nel ca duttale invasivo rispetto a ca duttale in situ. regola la progressione del cancro alla mammella, agisce come antagonista del pathway WNT e modula l'invasione delle cellule del cancro alla mammella. Le mutazioni associate alla malattia si riscontrano principalmente in piccole regioni denominate *mutation cluster region* (MCR) che determinano una proteina troncata.  
0015/A, ca duttale in situ  
APC, c.3922A>T, p.K1308\* AF 2.01%, COSM13727 (cfDNA)
- gene ALK** donne in post menopausa con carcinoma mammario recettore ormonale positivo/HER2-negativo e a bassa proliferazione hanno tratto beneficio dalla terapia neoadiuvante endocrina (NET)  
0022/A post menopausa RE+ HERB2- Ki67 2%  
ALK, c.3551G>A, p.G1184E AF 0.26% COSM1570337 (cfDNA)  
ALK, c.3599C>T, p.A1200V, AF 0,42%, COSM317003 (ctcDNA)
- gene TP53** mutazioni TP53 sono le alterazioni genetiche più frequenti nel cancro della mammella e sono associate a una malattia più aggressiva e ad una peggiore sopravvivenza globale. Le cellule di carcinoma mammario wild-type per TP53, positive al recettore estrogeno, che sono rese senescenti dal trattamento con doxorubicina, sono sensibili al tamoxifene.  
0017/A, RE+  
TP53, c.733G>A, p.G245S, AF 0,115%, COSM6932 (ctcDNA)
- gene FBXW7** soppressore del tumore, inibisce la proliferazione delle cellule del cancro alla mammella e promuove l'apoptosi almeno parzialmente attraverso il targeting per MTDH per la proteolisi.  
0017/A, LB  
FBXW7, c.1393C>T, p.R465C, AF 0,12%, COSM22932 (ctcDNA)

- gene IDH1**                   basso livello di espressione di IDH1 nel carcinoma mammario è significativamente correlato con lo stadio avanzato, metastasi linfonodali e scarsa sopravvivenza specifica di malattia (DSS)  
**0011/A, LA**  
IDH1, c.394C>T, p.R132C, AF 0,12%, COSM28747 (ctcDNA)
- gene DNMT3A**               molto rappresentato nel carcinoma triplo negativo (basal) promuove la transizione da epiteliale a mesenchimale EMT  
**0027/A, basal**  
DNMT3A, c.2644C>T, p.R882C AF 0.5%, COSM53042 (cfDNA)
- gene TSC1**                   legata a una proteina funzionale BRCA, nelle cellule di carcinoma mammario mutante BRCA1, che non hanno la capacità di riparare i danni del DNA mediante ricombinazione omologa.  
Espressione positivamente correlata con RE+, Pg+, T ridotto.  
**0011/A, RE+, Pg+, T 8 mm**  
TSC1, c.1907\_1908delAG p.E636fs\*51 AF 0.249%, COSM1636659 (cfDNA)

## **CONCLUSIONI**

La prima causa di morte nei pazienti oncologici è rappresentata dalla diffusione metastatica del tumore a partire dal sito primario.

Comprendere i meccanismi che portano la cellula tumorale primitiva a trasformarsi in una cellula tumorale a capacità metastatica è fondamentale affinché si possa bloccare il processo di invasione tumorale e formazione delle metastasi a distanza.

Il tumore è un *moving target*, cioè un bersaglio in continua evoluzione, tale da non poter essere effettivamente compreso nella sua complessità biologica dalle metodiche attualmente in uso. Infatti, ad oggi, la caratterizzazione bio-patologica del tumore è affidata ad esami istologici eseguiti su tessuti prelevati dal tumore stesso tramite biopsia o intervento chirurgico che però forniscono una fotografia istantanea della neoplasia, limitata al sito di prelievo e al momento del prelievo.

La biopsia liquida, basandosi sull'identificazione delle **CTC** (Cellule Tumorali Circolanti) nel sangue, sul **sequenziamento** del DNA tumorale estratto delle stesse CTC (**ctcDNA**) e sul DNA libero circolante (**cell-free DNA, cfDNA**), consentirebbe di conoscere in tempo reale il profilo genetico sia della lesione primaria che delle eventuali metastasi.

Il potenziale della metodica è veramente importante perché il riscontro della CTC nella circolazione sanguigna delle pazienti anni prima dell'inizio della malattia metastatica, consentirebbe di utilizzare la biopsia liquida come una valida metodica di diagnosi precoce, di monitoraggio non invasivo della sensibilità o resistenza alla terapia e di permettere la selezione delle pazienti che necessitano di una precoce terapia sistemica.

Quindi se vogliamo ridurre quel 30% di pazienti che a 10-15 anni non superano la malattia ci dobbiamo affidare a tecniche ultra specialistiche e sensibili che ci faranno avvicinare sempre di più all'obiettivo finale della LILT per i suoi 100 anni di attività: mortalità zero.

Terapia oncologica personalizzata.

Università degli Studi di Perugia																							
Sezione di Chirurgia Oncologica della Mammella e dei Tessuti Molli																							
Dir.: Prof. Antonio Rulli																							
RISERVATO																							
Biopsia Liquida Early Breast Cancer																							
N°	Code	Data prel.	Data nas.	Eta	ISOL.	G	ER	Pgr	Ki67	T	Her2	n.v.	Interv.	LS	D.A.	pTNM	1°CYC	2°CYC	Type	DNA ng	cfDNA	ctcDNA	
0	0000/A	11/04/2018		aa.43	sano												0						
9	0009/A	16/05/2018	15/03/1977	aa.41	sano												0				0,265		
15	0015/A	30/05/2018	04/03/1956	aa.62	sano												0				0,399	APC	n.v.
21	0021/A	20/06/2018	04/05/1941	aa.77	sano												0				0,29	NRAS	CTNNB1
0	0000/A	02/10/2017	09/02/1986	aa.32	cr.infil.	2	90	70	25	17	neg.	si	quad.	mic.		T1cN1m(s)							
24	0024/A	02/07/2018	10/07/1957	aa.61	cr.infil.	2	98	98	10	40	neg.	si	mast	pos.		T4N2				LA	0,242		
25	0025/A	02/07/2018	18/05/1958	aa.60	cr.infil.	2	95	50	28	21	neg.	no	quad	neg.		pT2.pN0				LA	0,239		
27	0027/A	11/07/2018	02/05/1941	aa.77									si		neg.						0,937	MT3A, APC	
31	0031/A	23/07/2018	01/01/1955	aa.63	in situ		98	70		12			no	quad.	neg.				1				
35	0035/A	30/07/2018	13/06/1947	aa.71															1				
1	0001/A	11/04/2018	06/06/1958	aa.60	cr.infil.	3	0	0	50	40	neg.	no		pos.		Stadio IV	1	f	B	2,831	n.v.	CTNNB1	
2	0002/A	11/04/2018	30/09/1957	aa.61	cr.infil.	3	95	30	70	50	neg.	no		pos.		Stadio IV	4		LB	40,32		CTNNB1, RET	
3	0003/A	09/05/2018	01/01/1968	aa.50	cr.infil.	2	90	50	15	80	neg.	si	mast.	pos.		pT3 N2a	1	1	LA	0,062			
4	0004/A	09/05/2018	10/06/1959	aa.59	cr.infil.	1	95	0	15	5	neg.	no	quad.	neg.		pT1a.pN0	2	0	LA	0,099			
5	0005/A	09/05/2018	30/11/1978	aa.40	cr.infil.	2	95	60	30	13	neg.	no	quad.	neg.		pT1c.pN0	6	1	LB	0,063			
6	0006/A	09/05/2018	03/08/1979	aa.39	cr.infil.	3	40	90	35	30	neg.	si	mast.	pos.		pT2.pN1a	7	4	LB	0,237	n.v.	n.v.	
7	0007/A	14/05/2018	01/06/1956	aa.62	cr.infil.	3	20	5	80	15	neg.	no	mast.	pos.		ypT0ypN0	1		LB	1,067	n.v.		
8	0008/A	14/05/2018	30/04/1957	aa.61	cr.infil.	1	99	70	3	10	neg.	si	quad.	neg.		pT1c N0	28	0	LA	0,44	n.v.		
10	0010/A	16/05/2018	26/07/1971	aa.47	cr.infil.	2	60	80	7	30	neg.	no				pT2	3		LA	0,114			
11	0011/A	21/05/2018	14/07/1959	aa.59	cr.infil.		80	80	5	8	neg.	no	quad.	neg.		pT1b N0(s)	1		LA	0,496	TSC1	IDH1	
12	0012/A	21/05/2018	30/03/1957	aa.61	cr.infil.	2	90	80	20	9	neg.	no	quad.	neg.		pT1b N0(s)	1		LA	0,321	n.v.		
13	0013/A	28/05/2018	20/10/1985	aa.33	cr.infil.	2	90	95	25	9	neg.	no	mast.	neg.		pT1b.N0	10	1	LB	0,268			
14	0014/A	28/05/2018	02/06/1984	aa.34	cr.infil.	3	95	20	35	12	neg.	si	quad.	mic.		pT1cN1m(s)	7	0	LB	0,156			
16	0016/A	30/05/2018	04/06/1954	aa.64	cr.infil.	1	95	95	14	6	neg.	no	quad.	neg.		pT1b.N0	1		LA	0,218		n.v.	
17	0017/A	06/06/2018	02/04/1959	aa.59	cr.infil.	2	70	0	40	23	neg.	no	quad.	neg.		pT2N0	3	3	LB	0,229		FBXW7, TP53	
18	0018/A	06/06/2018	06/06/1947	aa.71	cr.infil.	2	0	0	15	23	neg.	no	quad.	neg.		pT1b N0	3		B	0,108			
19	0019/A	13/06/2018	12/08/1949	aa.59	cr.infil.	1	95	95	5	15	neg.	no	quad.	neg.		pT1b N0(s)	0	1	LA	0,051			
20	0020/A	13/06/2018	15/01/1971	aa.47	cr.infil.	3	0	0	45	18	pos.	si	mast.	pos.		pT1c.pN1a(s)	1		Her	0,214			
22	0022/A	20/06/2018	26/10/1962	aa.56	cr.infil.	1	100	100	2	7	neg.	no	quad	neg.		pT1b. N0	2		LA	0,315	PIK3CA	NRAS, ALK,	
23	0023/A	25/06/2018	22/01/1964	aa.54	cr.infil.	L	100	80	10	10	pos.	si	mast	pos.		pT1b N3	0		LA	0,011		CDK42A, KRAS	
26	0026/A	10/07/2018	14/01/1960	aa.58	cr.infil.	L	100	0	2	9	neg.	no	quad	neg.		pT1b.N0	3	2	LA	0,371			
28	0028/A	16/07/2018	30/12/1967	aa.51	cr.infil.	2	100	70	2	12	neg.	no	quad.	pos.		pT1cN1a	1		LA				
29	0029/A	16/07/2018	22/07/1959	aa.59	cr.infil.	2	95	90	18	14	neg.	no	quad	neg.		pT1 N0	7	3	LA				
30	0030/A	18/07/2018	23/06/1971	aa.47	cr.infil.	2	60	95	15	8	neg.	no	quad.	neg.		pT1b N0(s)	0		LA				
32	0032/A	23/07/2018	31/12/1973	aa.45	cr.infil.	2	70	0	3	26	neg.	si	mast	pos.		T2 N1a	0		LA				
33	0033/A	24/07/2018	29/09/1957	aa.61	cr.infil.	3	0	0	40	35	neg.	si	mast	pos.		ypT2N0	1		B				
34	0034/A	24/07/2018	12/04/1948	aa.70	cr.infil.	2	90	10	3	7	neg.	no	quad.	neg.		pT1b N0(s)	1		LA				
36	0036/A	06/08/2018	07/09/1970	aa.48	cr.infil.	3	0	0	35	5	pos.	no	quad.	neg.		pT1a.pN0	5		Her				
37	0037/A	06/08/2018	25/07/1951	aa.67	cr.infil.	2	0	0	18	12	neg.	no	quad.	neg.		T1c N0(s)	4		B				

### GRUPPO di RICERCA

**Prof. Antonio Rulli**

Direttore ff: S.C. Chirurgia Generale e Oncologica - Polo Unico Ospedaliero Perugia  
Responsabile Scientifico del Progetto di Ricerca

**Prof. V. Talesa, Prof. C. Antognelli**

Dipartimento di Medicina Sperimentale – Università di Perugia

**Dr.ssa V. Ludovini, Dr.ssa AM. Siggillino**

Laboratorio di Biologia Molecolare, S.C. Oncologia Medica– Azienda Ospedaliera di Perugia

**Dr.ssa S. Zayik** – Data Manager (Lilt)

**Inf. Galli M.** – Case Manager (AO di Perugia)

Un ringraziamento particolare ai Membri del Gruppo Multidisciplinare Aziendale di Patologia della Mammella

Autorizzazione CEAS Umbria n° 3068 del 14.09.2017

**Progetto di Ricerca finanziato dalla LILT con fondi 5x1000 anno 2014**



## **BIBLIOGRAFIA**

1. Breast Cancer 2017, National Cancer Institute: The Surveillance, Epidemiology, and End Results Program
2. I numeri del cancro in Italia 2017. AIOM-AIRTUM-Fondazione AIOM. [www.aiom.it](http://www.aiom.it)
3. Epidemiologia del cancro della mammella, Registro Tumori Umbro di Popolazione, CancerStat Umbria 2014
4. Veronesi U, Saccozzi R, Del Vecchio M, Banfi A, Clemente C, De Lena M, Gallus G, Greco M, Luini A, Marubini E, Muscolino G, Rilke F, Salvadori B, Zecchini A, Zucali R. [Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy in patients with small cancers of the breast.](#) N Engl J Med. 1981 Jul 2;305(1):6-11.
5. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: Meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomized trials. Lancet 2011;378:1707-1716.
6. Collegio Italiano dei Senologi – linee guida 2016. La radioterapia nei tumori della mammella.
7. Veronesi U, Orecchia R, Maisonneuve P. Intraoperative radiotherapy versus external radiotherapy for early breast cancer (ELIOT): a randomised controlled equivalence trial. Lancet Oncol. 2013;14:1269- 1277. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70497-2
8. Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, Viale G, Zurrada S, Bedoni M, Costa A, de Cicco C, Geraghty JG, Luini A, Sacchini V, Veronesi P. [Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes.](#) Lancet. 1997 Jun 28;349(9069):1864-7.
9. Veronesi U, Zurrada S, Galimberti V. [Consequences of sentinel node in clinical decision making in breast cancer and prospects for future studies.](#) Eur J Surg Oncol. 1998 Apr;24(2):93-5.
10. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Galimberti V, Luini A, Zurrada S, Robertson C, Sacchini V, Veronesi P, Orvieto E, De Cicco C, Intra M, Tosi G, Scarpa D. [Sentinel lymph node biopsy and axillary dissection in breast cancer: results in a large series.](#) J Natl Cancer Inst. 1999 Feb 17;91(4):368-73.
11. Veronesi U, Zurrada S. Optimal surgical treatment of breast cancer. The oncologist 1996; 1:340-346.
12. Mansel RE, Goyal A, Newcombe RG; ALMANAC Trialists Group. Internal mammary node drainage and its role in sentinel lymph node biopsy: the initial ALMANAC experience. Clin Breast Cancer. 2004;5(4):279-84;
13. Krag D, Weaver D, Ashikaga T, Moffat F, Klimberg VS, Shriver C, *et al*: The sentinel node in breast cancer -- a multicenter validation study. N Engl J Med. 1998; 339(14): 941-946
14. Peg V, Espinosa-Bravo M, Rubio IT, *et al*: Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node: a new predictor of axillary status in early breast cancer patients. Breast Cancer Res Treat 2013; 139:87-93.
15. Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, Kaneko T, *et al*: Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. Clin Cancer Res 2009 15(8): 2879-2884
16. Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink AA, *et al*: Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. Int J Cancer 2008 122(11):2562-2567
17. Galimberti V, Cole BF, Zurrada S, Viale G, *et al*: Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial. Lancet Oncol. 2013; 14(4):297-305
18. Giuliano AE, Hunt KK, Ballman KV, Beitsch PD *et al*: Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. JAMA 2011; 305(6):569-575
19. Tinterri C, Canavese G, Bruzzi P, *et al*: SINODAR ONE, an ongoing randomized clinical trial to assess the role of axillary surgery in breast cancer patients with one or two macrometastatic sentinel nodes. Breast 2016 Jul 9
20. Morrow M: Personalizing extent of breast cancer surgery according to molecular subtypes. The Breast 22 (2013) S106-S109
21. Van Zee KJ, Manasseh DM, Bevilacqua JL, *et al*: A nomogram for predicting the likelihood of additional nodal metastases in breast cancer patients with a positive sentinel node biopsy. Ann Surg Oncol 2003; 10(10): 1140-51.
22. Vaidya JS, Baum M, Tobias JS, Massarut S, Wenz F, Murphy O, Hilaris B, Houghton J, Saunders C, Corica T, Roncadin M, Kraus-Tiefenbacher U, Melchaert F, Keshtgar M, Sainsbury R, Douek M, Harrison E, Thompson A, Joseph D. Targeted intraoperative radiotherapy (TARGIT) yields very low recurrence rates when given as a boost. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2006 Dec 1;66(5):1335-8.
23. Reitsamer R, Sedlmayer F, Kopp M, Kametrise G, Menzel C, Deutschmann H, Nairz O, Hitzl W, Peintinger F. The Salzburg concept of intraoperative radiotherapy for breast cancer: results and considerations Int J Cancer. 2006 Jun 1;118(11):2882-7.
24. Reitsamer R, Peintinger F, Koop M, Menzel C, Kogelnik HD, Sedlmayer F. Local recurrence rates in breast cancer patients treated with intraoperative electron-boost radiotherapy versus postoperative external-beam electron-boost irradiation. Strahlentherapie und Onkologie. 180:38-44. 2004

25. Kraus-Tiefenbacher U, Scheda A, Steil V, Hermann B, Kehrer T, Bauer L, Melchert F, Wenz F. Intraoperative radiotherapy (IORT) for breast cancer using the Intrabeam system. *Tumori*. 2005 Jul-Aug;91(4):339-45.
26. Caudle AS, Gonzalez-Angulo AM, Hunt KK, Pusztai L, Kuerer HM, Mittendorf EA: [Impact of progression during neoadjuvant chemotherapy on surgical management of breast cancer](#). *Surg Oncol*. 2011 Apr;18(4):932-8.
27. *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG)*: Long-term outcomes for neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in early breast cancer: meta-analysis of individual patient data from ten randomised trials. [Lancet Oncol](#). 2018 Jan;19(1):27-39.
28. Senkus E., Kyriakides S., Ohno S., Penault-Llorca F., *et al* Primary breast cancer: ESMO Clinical practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 26, 8-30, 2015.
29. Giuliano AE, *et al.*: Breast cancer- Major changes in the American joint committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017 Jul 8;67 (4):290-303
30. Pantel K., Alix-Panabières C., Riethdorf S., 2009. Cancer micrometastases. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 6, 339–351. 10.
31. Vincent-Salomon A., Bidard F.C., Pierga J.Y., 2008. Bone marrow micrometastasis in breast cancer: review of detection methods, prognostic impact and biological issues. *J. Clin. Pathol*. 61, 570–576.
32. Diel I.J., Jaschke A., Solomayer E.F., Gollan C., Bastert G., Sohn C., Schuetz F., 2008. Adjuvant oral clodronate improves the overall survival of primary breast cancer patients with micrometastases to the bone marrow: a long-term follow-up. *Ann. Oncol*. 19, 2007–2011.
33. Hoffmann O., Aktas B., Goldnau C., Heubner M., Oberhoff C., Kimmig R., Kasimir-Bauer S., 2011. Effect of ibandronate on disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with primary breast cancer: a pilot study. *Anticancer Res*. 31, 3623–3628
34. Naume B., Synnestvedt M., Falk R.S., Wiedswang G., Weyde K., Risberg T., Kersten C., Mjaaland I., Vindi L., Sommer H.H., Sætersdal A.B., Rypdal M.C., Bendigtsen Schirmer C., Wist E.A., Borgen E., 2014. Clinical outcome with correlation to disseminated tumor cell (DTC) status after DTC-guided secondary adjuvant treatment with docetaxel in early breast cancer. *J. Clin. Oncol*. 32, 3848–3857.
35. Bidard F.C., Pierga J.-Y., Soria J.-C., Thiery J.P., 2013. Translating metastasis-related biomarkers to the clinic—progress and pitfalls. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 10, 169–179.
36. Bidard F.-C., Pierga J.-Y., Vincent-Salomon A., Poupon M.-F., 2008. A “class action” against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis?. *Cancer Metastasis Rev*. 27, 5–10.
37. Min Yu *et al.* (2011) Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol* 193,3:373-382
38. Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, *et al.*: Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*. 2012; 12: 178.
39. Samatov TR, Tonevitsky AG, Schumacher U. Epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds. *Mol Cancer*. 2013 Sep 23;12(1):107.
40. Thiery, J.P., 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat.Rev. Cancer* 2, 442-454.
41. Ring, A., Mineyev, N., Zhu, W., Park, e., Lomas, C., Punj, V., Yu, M., Barrak, D., Forte, V., Porras, T., *et al.* 2015. EpCAM based capture detects and recovers circulating tumour cells from all subtypes of breast cancer except claudin-low. *Oncotarget*.
42. Mostert B., Kraan J., Bolt-de Vries J., van der Spoel P., Sieuwerts A.M., Schutte M., Timmermans A.M., Foekens R., Martens J.W.M., Gratama J.-W., Foekens J.A., Sleijfer S., 2011. Detection of circulating tumor cells in breast cancer may improve through enrichment with anti-CD146. *Breast Cancer Res. Treat.* 127, 33–41
43. Mostert B., Kraan J., Sieuwerts A.M., van der Spoel P., Bolt-de Vries J., Prager-van der Smissen W.J.C., Smid M., Timmermans A.M., Martens J.W.M., Gratama J.W., Foekens J.A., Sleijfer S., 2012. CD49f-based selection of circulating tumor cells (CTCs) improves detection across breast cancer subtypes. *Cancer Lett*. 319, 49–55
44. Onstenk W., Kraan J., Mostert B., Timmermans M.M., Charehbili A., Smit V.T.H.B.M., Kroep J.R., Nortier J.W.R., van de Ven S., Heijns J.B., Kessels L.W., van Laarhoven H.W.M., Bos M.M.E.M., van de Velde C.J.H., Gratama J.W., Sieuwerts A.M., Martens J.W.M., Foekens J.A., Sleijfer S., 2015. Improved circulating tumor cell detection by a combined EpCAM and MCAM CellSearch enrichment approach in patients with breast cancer undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Mol. Cancer Ther.* 14, 821–827.
45. Satelli A., Brownlee Z., Mitra A., Meng Q.H., Li S., 2015. Circulating tumor cell enumeration with a combination of epithelial cell adhesion molecule- and cell-surface vimentin-based methods for monitoring breast cancer therapeutic response. *Clin. Chem*. 61, 259–266.
46. Soo Joeng Lee, Cham Han Lee, Sung Ho Choi, Byung Hee Jeon *et al.* Evaluation of a novel approach to circulating tumor cell isolation for cancer gene panel analysis in patients with breast cancer. *Oncology Letters* 13: 3025-3031, 2017.
47. Ashworth TR *et al.* (1869) A case of cancer in which cells similar to those in the tumor were seen in the blood after death. *Aust Med J* 14:146-149.
48. Lo, Y.D., Corbetta N., Chamberlain, *et al* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997, 350, 485-487.
49. Leon SA, Shapiro B, *et al.*: Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977, 37, 646-650.
50. Tada M, Omata M, Kawai S, *et al.*: Detection of ras gene mutation in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1993, 53, 2472-2474.

51. Jahr S, Hentze H, Englisch S, *et al.*: DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantification and evidence of their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001, 61, 1659-1665.
52. Haber DA, Velculescu VE.: Blood-based analyses of cancer: Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov.* 2014, 4, 650-661.
53. Diehl F, Schimdt K, Choti MA, *et al.*: Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat.Med.* 2008, 14, 985-990.
54. Jiang P., Chan C.W., Chan K.A., Cheng S.H., Wong J., Wong V.W., Wong G.L., Chan S.L., Mok T.S., Chan H.L., *et al.* Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015;112:E1317–E1325
55. Madhavan D., Wallwiener M., Bents K., Zucknick M., Nees J., Schott S., Cuk K., Riethdorf S., Trumpp A., Pantel K., *et al.* Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2014;146:163–174.
56. Allard WJ, Matera J, Miller MC, *et al.*: Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(20): 6897–904.
57. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, *et al.*: Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2004; 351(8): 781–91
58. De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, *et al.*: Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(19): 6302–9.
59. Cohen SJ, Alpaugh RK, Gross S, *et al.*: Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2006; 6(2): 125–32.
60. Adams DL, Stefansson S, Haudenschild C, *et al.*: Cytometric characterization of circulating tumor cells captured by microfiltration and their correlation to the CellSearch® CTC test. *Cytometry A.* 2015; 87(2): 137–44.
61. Li P, Stratton ZS, Dao M, *et al.*: Probing circulating tumor cells in microfluidics. *Lab Chip.* 2013; 13(4): 602–9.
62. Harouaka R, Kang Z, Zheng SY, *et al.*: Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications. *Pharmacol Ther.* 2014; 141(2): 209–21.
63. Toss A, Mu Z, Fernandez S, *et al.*: CTC enumeration and characterization: moving toward personalized medicine. *Ann Transl Med.* 2014; 2(11): 108.
64. Lucci A, Janni WJ, Rack B, *et al.*: Pooled analysis of the prognostic relevance of circulating tumor cells in primary breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2016 May 15;22 (10): 2583-93.
65. Meng, S., Tripathy, D., Shete, S., Ashfaq, R., Haley, B., Perkins, S., Beitsch, P., Khan, A., Euhus, D., Osborne, C., Frenkel, E., Hoover, S., Leitch, M., Clifford, E., Vitetta, E., Morrison, L., Herlyn, D., Terstappen, L.W.M.M., Fleming, T., *et al* 2004. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 9393-9398.
66. Janni, W., 2015. Association between HER2-Phenotype on Circulating Tumor Cells and Primary Tumor Characteristics in Women with Metastatic Breast cancer. Presented at the European Cancer Conference, Vienna.
67. Bidard, F.-C., Pierga, J.Y., 2015. Clinical utility of circulating tumor cells in metastatic breast cancer. *J.Clin. Oncol.* 33, 1622.
68. Ignatiadis M, Rack B, Rothè F, Riethdorf S, Decraene C, Bonnefoi H, *et al*: Liquid biopsy-based clinical research in early breast cancer: The EORTC 90091-10093 Treat CTC trial. *European Journal of Cancer* 63 (2016) 97-104.
69. Zhou L, Dicker DT, *et al.*: Circulating tumor cells: silent predictors of metastasis. *F1000Res.* 2017 Aug 14;6. Faculty Rev-1445.
70. Haber DA, Velculescu VE: Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov.* 2014; 4(6): 650–61.
71. Ignatiadis M, Lee M, Jeffrey SS: Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility. *Clin Cancer Res.* 2015; 21(21): 4786–800.
72. Alix-Panabières C, Pantel K: Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov.* 2016; 6(5): 479–91.
73. Dawson S.J., Tsui D.W., Murtaza M., Biggs H., Rueda O.M., Chin S.F., Dunning M.J., Gale D., Forshew T., Mahler-Araujo B., *et al.* Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2013;368:1199–1209.
74. Garcia-Murillas I., Schiavon G., Weigelt B., Ng C., Hrebien S., Cutts R.J., Cheang M., Osin P., Nerurkar A., Kozarewa I., *et al.* Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci. Transl. Med.* 2015;7:302ra133.
75. Bidard FC, Proudhon C, Pierga JV: Circulating Tumor Cells in Breast Cancer. *Molecular Oncology* 10 (2016) 418-430
76. Madic J., Kiiälainen A., Bidard FC, Birzele F., Ramey G., Leroy Q., Rio Frio T., *et al* 2015 Circulating tumor DNA and circulating tumor cells in metastatic triple negative breast cancer patients. *Int. J. Cancer* 136, 2158-2165.
77. Bidard FC, Weigelt B., Reis-Filho JS., 2013a Going with the flow: from circulating tumor cells to DNA. *Sci. Transl. Med.* 5.
78. Budd GT, Cristofanilli M, Ellis MJ, *et al* Circulating tumor cells versus imaging-predicting overall survival in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12:6403-6409.
79. Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, *et al* Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 2006;12:4218-4224.

80. Hall CS, Karhade MG, Bowman Bauldry JB, Anthony Lucci, et al: Prognostic value of circulating tumor cells identified before surgical resection in non metastatic breast cancer patients. 2016 American College of Surgeons. Elsevier Inc.
81. Krishnamurthy S, Cristofanilli M, Singh B, et al Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer. *Cancer* 2010; 116:3330-3337.
82. Bidard FC, Mathiot C, Delaloge S, et al: Single circulating tumor cell detection and overall survival in newly diagnosed breast cancer. *Breast Cancer Res* 2012; 14: R133
83. Franken B, de Groot MR, Mastboom WJ, et al: Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2014:106.
84. Riethdorf S, Muller V, Zhang L, et al : Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant Gepar-Quattro trial. *Clin Cancer Res* 2010; 16:2634-2645.