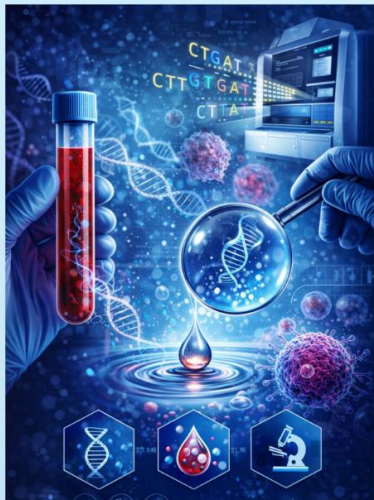




Con il Patrocinio di:



## L'INTRODUZIONE della BIOPSIA LIQUIDA nella DIAGNOSTICA ONCOLOGICA



TORINO, 8 GIUGNO 2026

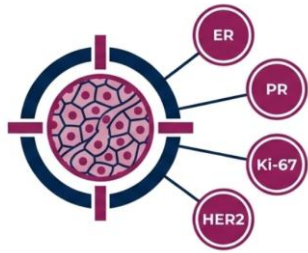
AULA LENTI - Presidio Molinette  
Ingresso da Corso Bramante 88 - TORINO

## *Metodologie analitiche per lo studio della biopsia liquida nel Carcinoma Mammario*

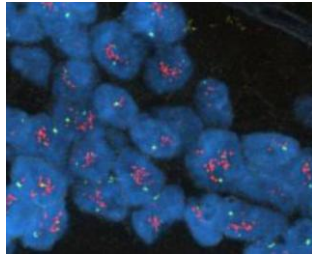
*Paola Francia di Celle*

*Lab. Patologia Molecolare SCU Anatomia Patologica Città della  
Salute e della Scienza di Torino*

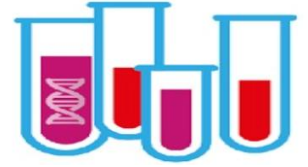




**Chirurgia e  
Stadiazione  
(Tessuto)**



**Sospetto di  
Progressione  
(Immagini)**



**Prima  
Diagnosi  
(Tessuto)**



**Chirurgia e  
Stadiazione  
(Tessuto)**



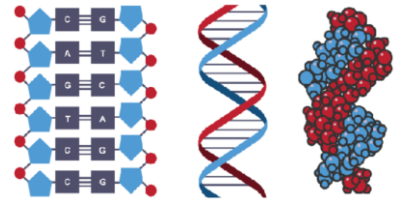
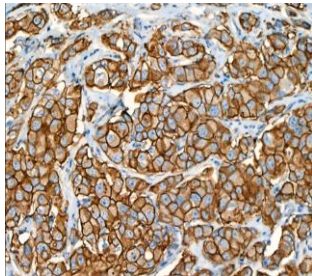
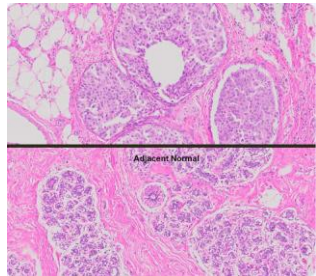
**Follow-up  
Standard e  
Prospettive**



**Sospetto di  
Progressione  
(Immagini)**



**Caratterizzazione  
alla Progressione  
(Tessuto + Liquida)**



# mBC HR+/HER2-

## Biopsia Solida



## Biopsia Liquida (ctDNA)



<b>Ruolo principale</b>	Diagnosi istologica, grading, ER, PR, Ki-67, HER2, classificazione molecolare iniziale (Luminal A/B, HER2+, Triple Negative).	Monitoraggio della risposta, identificazione dei meccanismi di resistenza, rilevazione precoce delle recidive (MRD).
<b>Rappresentatività</b>	Limitata dall'eterogeneità intratumorale: analizza solo la porzione di tessuto campionata.	Panoramica globale: raccoglie il DNA rilasciato da tutte le lesioni metastatiche presenti nell'organismo.
<b>Invasività</b>	Alta (richiede agoaspirato, biopsia core o intervento chirurgico).	Minima (semplice prelievo di sangue venoso).
<b>Ripetibilità</b>	Difficile e rischiosa da eseguire serialmente durante il trattamento.	Altamente ripetibile (anche ogni poche settimane/mesi)
<b>Limiti tecnici</b>	Tessuto scarso o degradato (es. blocchetti in paraffina vecchi); tempi di refertazione più lunghi.	Rischio di falsi negativi se il tumore rilascia poco DNA (basso <i>shedding</i> ); interferenza dell'ematopoiesi clonale (CHIP).

# mBC HR+/HER2-

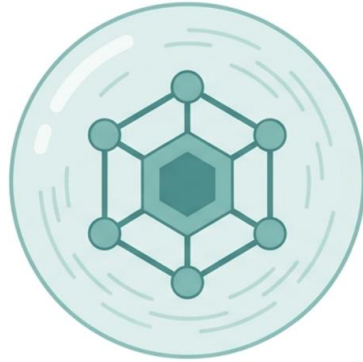
Gene	Opzione Terapeutica (ESMO)	Livello ESCAT	Linea di trattamento
<b>PIK3CA</b>	Alpelisib o Inavolisib + Fulvestrant (+ Palbociclib in early resistance)	<b>IA</b>	Prima linea (Inavolisib in combinazione, se resistenza precoce a precedenti anti-aromatasi adiuvanti) o Seconda linea (Alpelisib + Fulvestrant, dopo progressione da inibitore CDK4/6)
<b>AKT1</b>	Capivasertib + Fulvestrant	<b>IA</b>	Seconda linea (Dopo progressione o recidiva durante/dopo una terapia endocrina, tipicamente contenente un inibitore CDK4/6)
<b>PTEN</b>	Capivasertib + Fulvestrant (Inibitori pathway AKT)	<b>IB</b>	Seconda linea (Dopo progressione o recidiva durante/dopo una terapia endocrina, analogamente alle alterazioni di AKT1)
<b>ESR1</b>	Elacestrant / SERD orali	<b>IA</b>	Seconda linea (Monoterapia indicata dopo progressione ad almeno una linea di terapia endocrina comprendente un inibitore CDK4/6)
<b>BRCA1/2</b>	PARP inibitori (Olaparib, Talazoparib)	<b>IA</b>	Prima o Seconda linea (A seconda dell'esposizione precedente alla chemioterapia adiuvante o per la malattia metastatica, tipicamente alternativi o successivi alla prima linea endocrina)

**ESCAT**

**ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets**

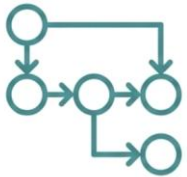


## Alterazioni Somatiche Driver (Stabili)



**Presenti fin dalle fasi precoci** nel tumore primitivo e persistenti nelle lesioni metastatiche. Rappresentano l'**impronta genetica di base**.

### Via PI3K/AKT/PTEN



Genotipi Chiave:  
PIK3CA, AKT1, PTEN

### Riparazione del DNA



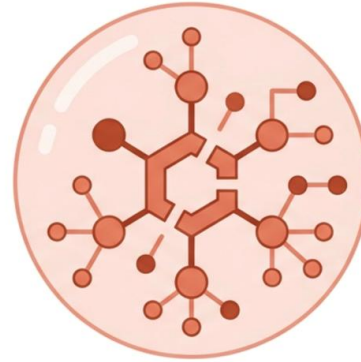
Genotipi Chiave:  
gBRCA1/2, gPALB2

### Ciclo Cellulare e Sopravvivenza

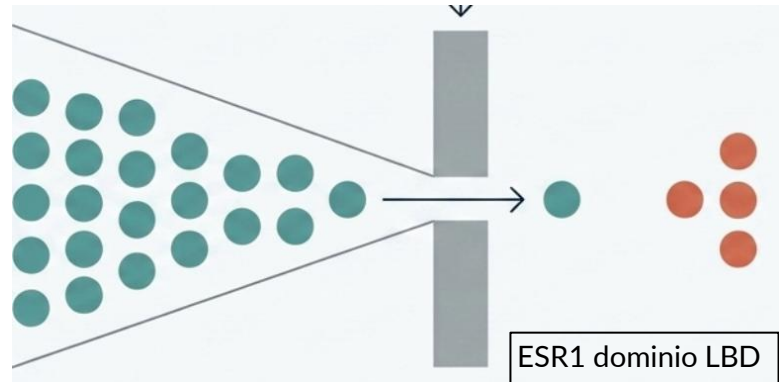


Genotipi Chiave:  
CCND1, TP53

## Mutazioni Acquisite (Pressione Selettiva)



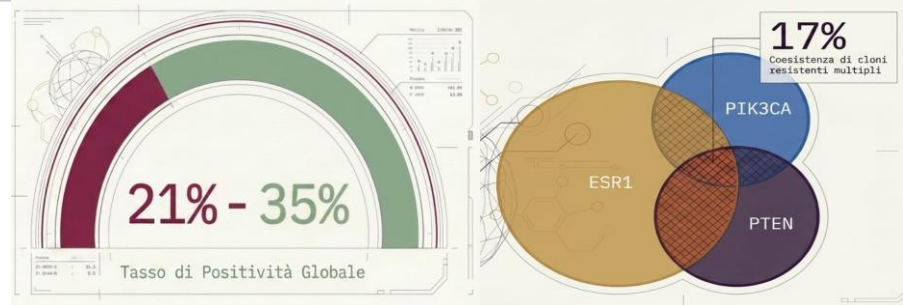
**Emergono sotto la spinta della terapia.** Segnano l'**evoluzione del tumore** verso **nuovi meccanismi di sopravvivenza**.



ESR1 dominio LBD

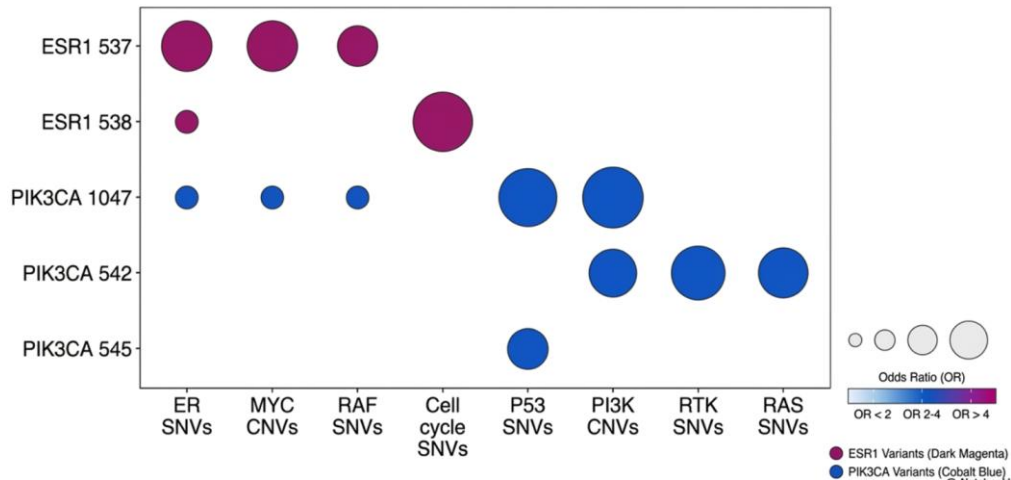
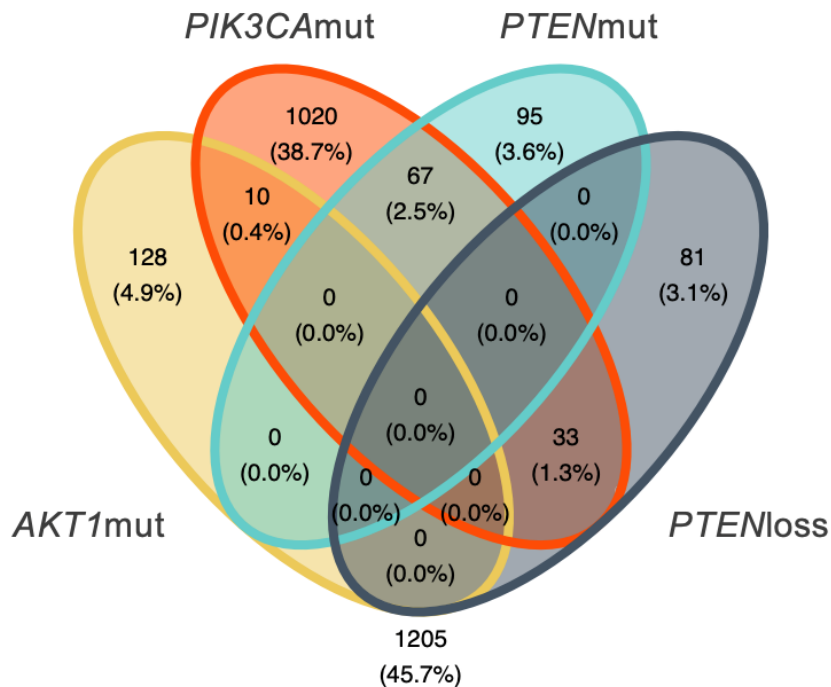
## mBC HR+/HER2-

Gene	Funzione Principale	Prevalenza nel Tumore Primario	Prevalenza nella Malattia Metastatica	Tipo di Alterazione Prevalente
<b>PIK3CA</b>	Oncogene	~30% - 35%	~35% - 40%	Mutazioni specifiche a singolo nucleotide (Hotspot)
<b>ESR1</b>	Recettore Estrogenico (Resistenza)	<1% (Rarissimo)	~20% - 40% ( <i>Post-terapia</i> )	Mutazioni acquisite nel dominio di legame del ligando
<b>PTEN</b>	Oncosoppressore	~4% - 5%	~10% - 13%	Delezioni geniche complete o mutazioni frameshift
<b>AKT1</b>	Oncogene	~2% - 3%	~4% - 5%	Mutazione hotspot specifica (E17K)



Heat-map showing the association of the main ESR1 and PIK3CA codon variants with concomitant ctDNA alterations in other oncogenic pathways.

PI3K/AKT pathway alterations co-occurrence in the first 3 lines of therapy (n=2,639)



Gerratana et al. Breast Cancer Research (2023) 25:112

ESR1/PIK3CA co-occurrence 4(1L)-17%(3L)

# Clinical and Genomic Factors Associated with Eliceastrant Outcomes in *ESR1*-Mutant Metastatic Breast Cancer

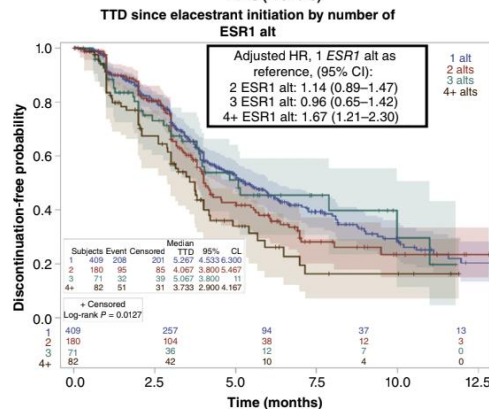
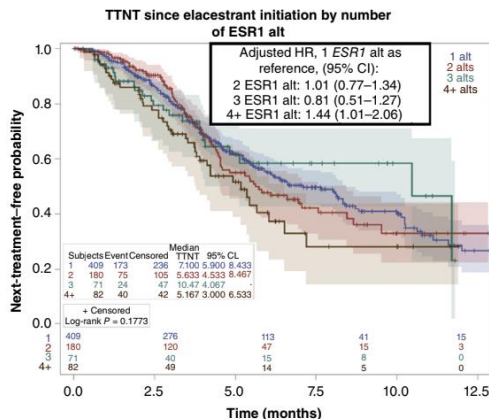


742 pts

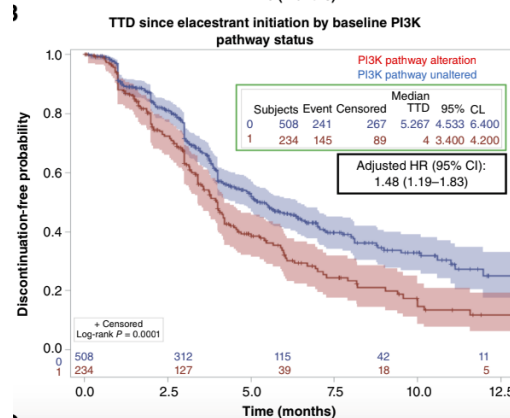
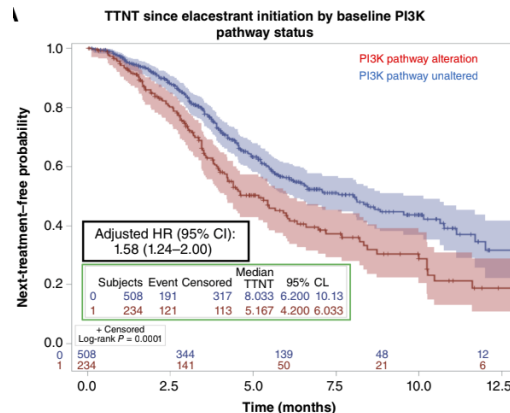
A) >4 ESR1 variants (11%)

A) Dual ESR1 and PI3K pathway mutation (31.5%)

A

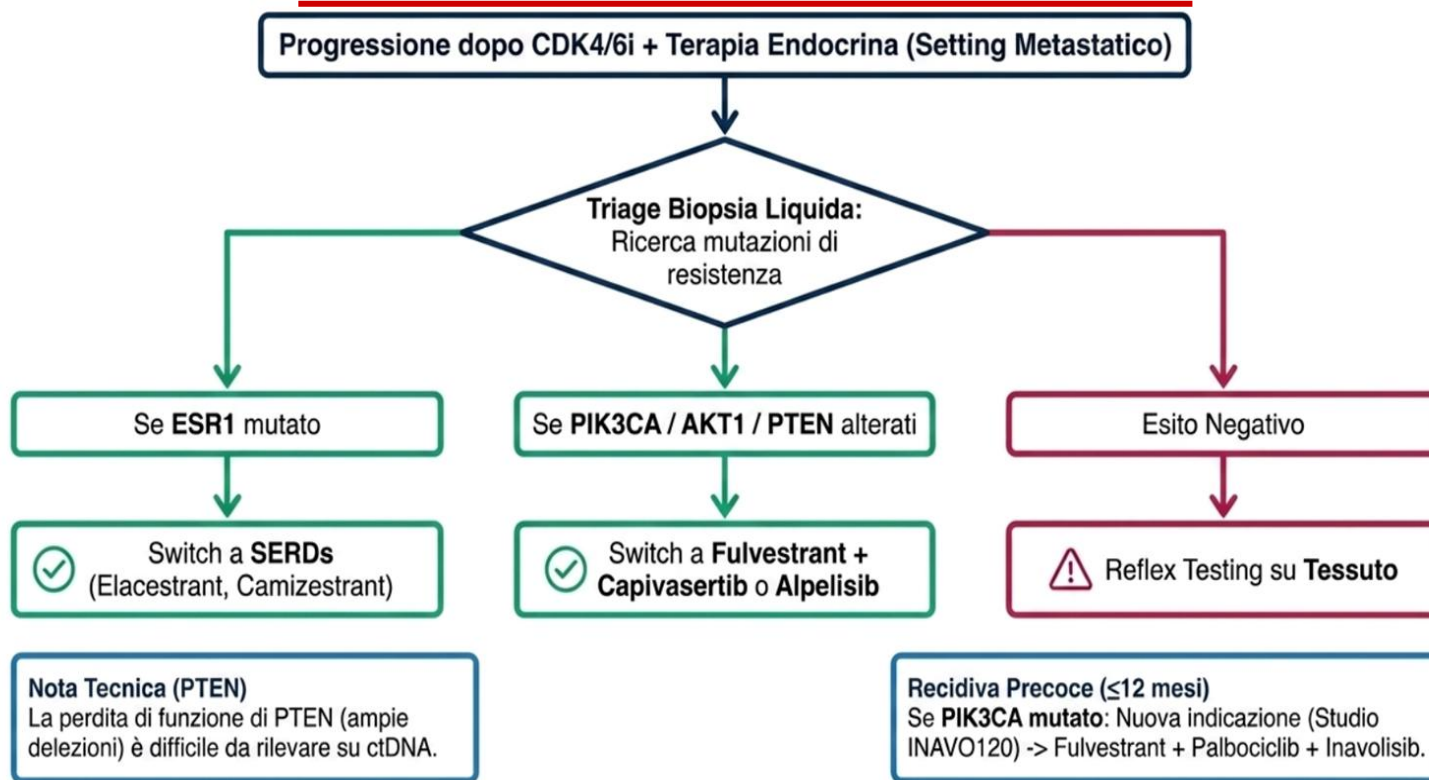


B



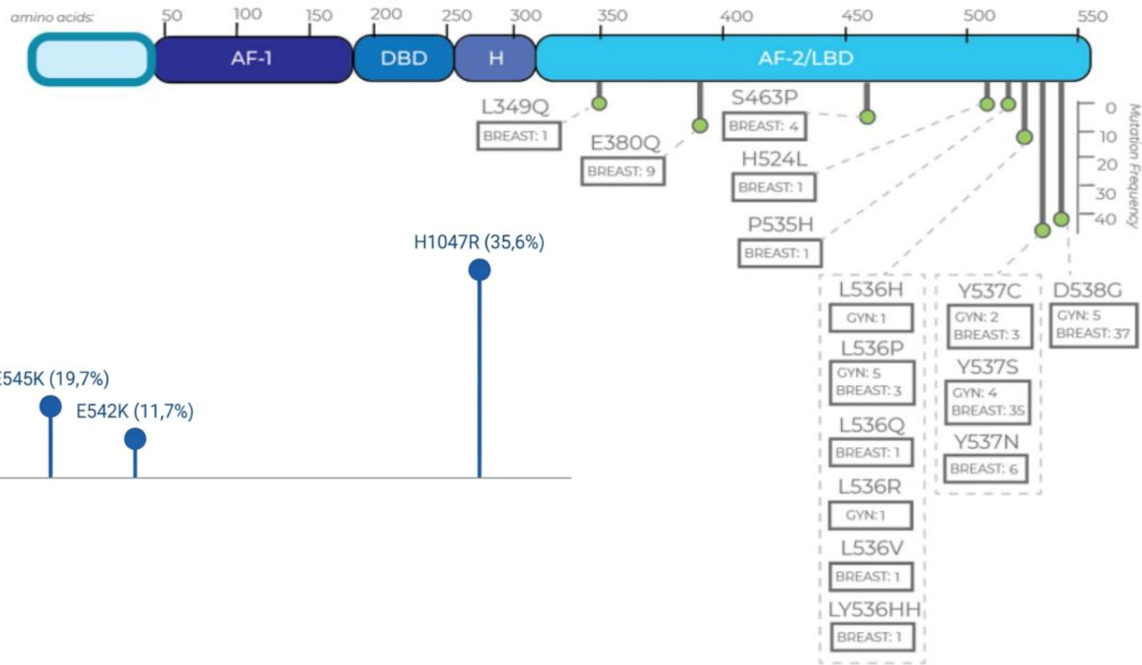
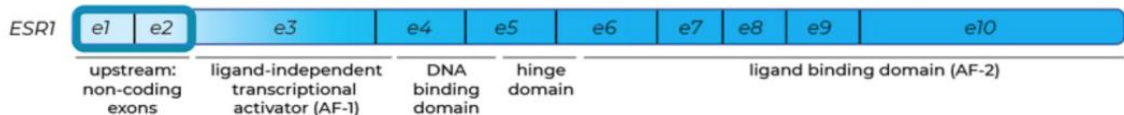
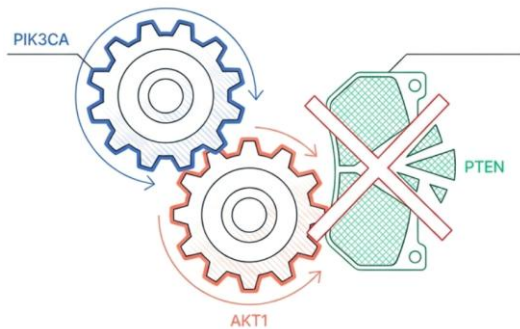


## Algoritmo Clinico: Carcinoma Mammario (HR+/HER2-)





## Workflow diagnostico



### PIK3CA

Nota: le varianti non-hotspot sono più comuni nella malattia ER-/HER2- (42%).

### AKT1

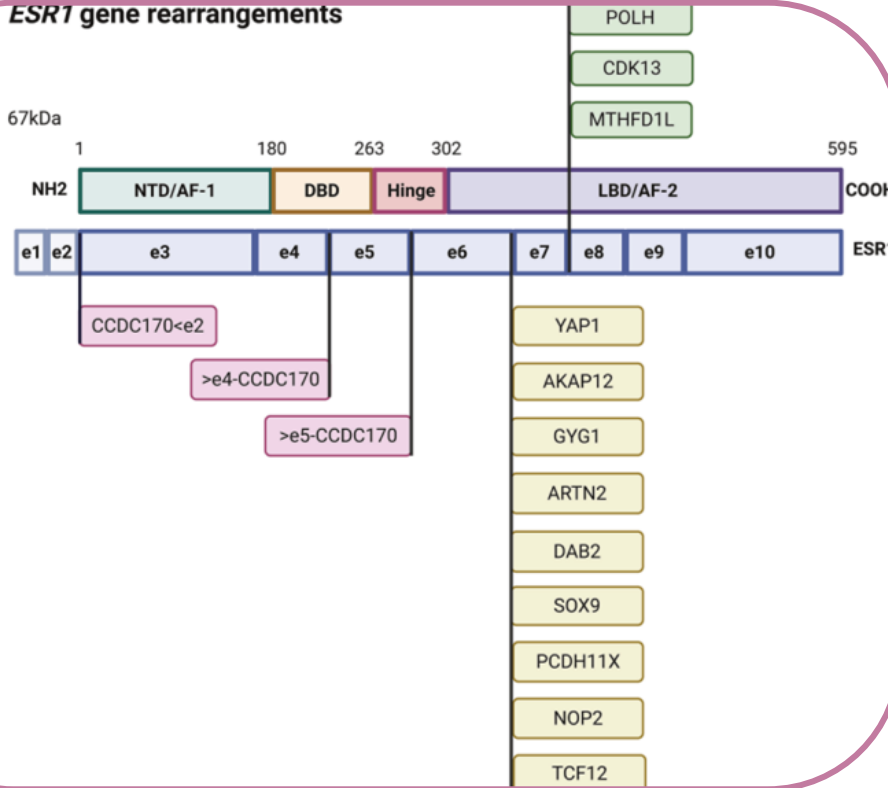
Dominanza assoluta di E17K (69,7%).

### PTEN

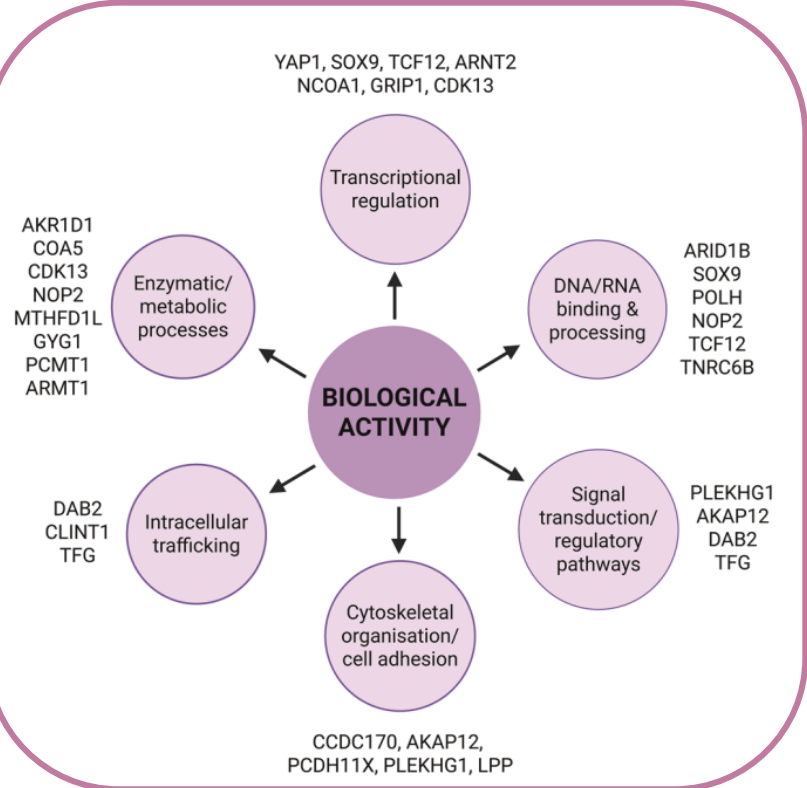
Assenza di un singolo hotspot dominante. Elevata prevalenza di mutazioni frameshift (41,9%) e missenso (28,7%) distribuite lungo l'intera proteina.

## Genomic rearrangements involving the *ESR1* gene.

### *ESR1* gene rearrangements



## Biological functions of *ESR1* fusion partners.



**Table 1.** Analytical performance of commercial PCR-based assays for *ESR1m* detection in liquid biopsy

Assay name and manufacturer <sup>a</sup>	Sensitivity (%)	Input DNA (ng)	<i>ESR1</i> hotspot mutation coverage											Turnaround time	
			E380Q	V422del	S462Q	L536P	L536H	L536R	Y537C	Y537D	Y537N	Y537S	D538G		Others
<b>Quantitative PCR (qPCR)</b>															
QuantiDeX exoMutater Kit (Asuragen)	0.025–0.082	NS	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		5–6 hours
APIS <i>ESR1</i> qPCR Kit (APIS Assay Technologies)	0.500%	10–30	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	P535H, L536Q	2 hours
GALEAS uPCR: <i>ESR1</i> Kit (Nonacus)	0.040–0.330%	25 ng	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	P535H, L536Q	3 hours
AmoyDx Super-SURMS <i>ESR1</i> PCR Kit (AmoyDx)	0.050–0.200%	30 ng	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	G344D, H356D, H356Y, L370F, L379I, E380K, V418E, G442R, L469V, H52AL, V534E, L536E, L536K, L536G, Y537H, D538N, D538Y, L549P	5–6 hours
<b>Digital PCR (dPCR)</b>															
dPCR dPLEX <i>ESR1</i> Mutation Detection (Bio-Rad) <sup>c</sup>	0.010–0.025%	2–ng	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		< 8 hours
dPCR (17 mutations) Crystal Digital PCR Assay (Stilla Technologies)	0.120–0.150	17.5–20 ng	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	D538N, L536Q_delinsAG, Y537H, Y537N_delinsTA, Y537S_delinsAG, Y537S_delinsCA	NS
APIS <i>ESR1</i> dPCR Kit (APIS Assay Technologies)	0.100%	10–30 ng	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	L536Q, P535H	< 4 hours
Droplex <i>ESR1</i> Mutation Test (Gencurix) <sup>c</sup>	0.500%	25 ng	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	V534E, L536Q, L536G, L536K, Y537H, D538E	NS

<sup>a</sup>All assays are for research use only, except Gencurix Droplex, approved for *in vitro* diagnostics.

<sup>b</sup>Percentage refers to the lowest reliable variant allelic frequency detected >95% of the time. Ranges indicate mutation variability.

<sup>c</sup>Updated Bio-Rad assay with 11 *ESR1m* coverage will be available soon.

Abbreviations: dPCR, digital PCR, *ESR1m*, *ESR1* mutations; NS, not specified; PCR, polymerase chain reaction; qPCR, quantitative PCR.

**Table 2.** Analytical performance of commercial NGS-based assays for *ESR1m* detection in liquid biopsy.

NGS assay name and manufacturer	Study	<i>ESR1</i> exon coverage <sup>b</sup>	Sensitivity <sup>b</sup>	Turnaround time
Guardant360 CDx (Guardant Health)	Gerratana et al. [62]; Jacob et al. [63]	4–8 <sup>c</sup>	0.2–1.1%	7 days
FoundationOne Liquid CDx (FoundationOne)	Woodhouse et al. [64]	4–8	0.4%	NS
OncoPrint Breast ctDNA Assay (Thermo Fisher Scientific)	Dhingra et al. [65]; Nteliopoulos et al. [66]	5, 7, 8	0.1%	2 days
InVisionSeq ctDNA Assay (NeoGenomics)	Gale et al. [67]; Nteliopoulos et al. [66]	4, 8	0.5–0.33%	NS
Ion AmpliSeq Custom DNA Panel (Thermo Fisher Scientific)	Yanagawa et al. [68]; Guttery et al. [43]; Shaw et al. [43]	NS	0.2–3.0%	1 day
Plasma-SeqSensel Breast Cancer IVD Kit (Sysmex) <sup>d</sup>	Martens et al. [70]; Virga et al. [71]	5, 7, 8	0.0%	2 days
QIAseq Targeted DNA Panel Kit (QIAGEN)	Keup et al. [72]; Callens et al. [11]	Full CDS	0.1%	NS
PredicineCARE Ultra (Predicine)	Liao et al. [73]	NS	0.06%	6 days
MammaSeq <sup>d</sup>	Smith et al. [74]	Hotspots only	0.1%	NS
oncoReveal core LBx (Pillar Biosciences)	Cao et al. [75]	4–8	0.15%	< 3 days
AVENIO ctDNA Expanded Kit V2 (Roche)	Rojo et al. [76]	Full CDS	0.5%	5 days
AmoyDx HANDLE Breast Cancer Liquid NGS Panel (AmoyDx)	–	4–8	0.2–1%	2–3 days

<sup>a</sup>Exon coverage and numbering is based on the consensus CDS CCDS5234.1.

<sup>b</sup>Percentage refers to the lowest variant allelic frequency that can be reliably detected > 95% of the time. A range indicates variability depending on specific mutation or concentration of input DNA.













<sup>c</sup>Guardant360 CDx specifies the following 23 *ESR1m* are covered: K303R, E380Q, V392I, S436P, S466P; L469N; R503W; V534E; L36H; L536I; L536P; L536R; L536Q; L536G; L536K; Y537S; Y537C; Y537D; Y537H; Y537N; D538G; D538E; T594R.

<sup>d</sup>Not currently available in the US.

<sup>e</sup>Only available through University of Pittsburgh Medical Center.

Abbreviations: CDS, coding sequence; cfDNA, cell-free DNA; ctDNA, circulating tumor DNA, *ESR1m*, *ESR1* mutations; IVD, in vitro diagnostic; LBx, liquid biopsy; NGS, next-generation sequencing; NS, not specified.

## Strategie analitiche

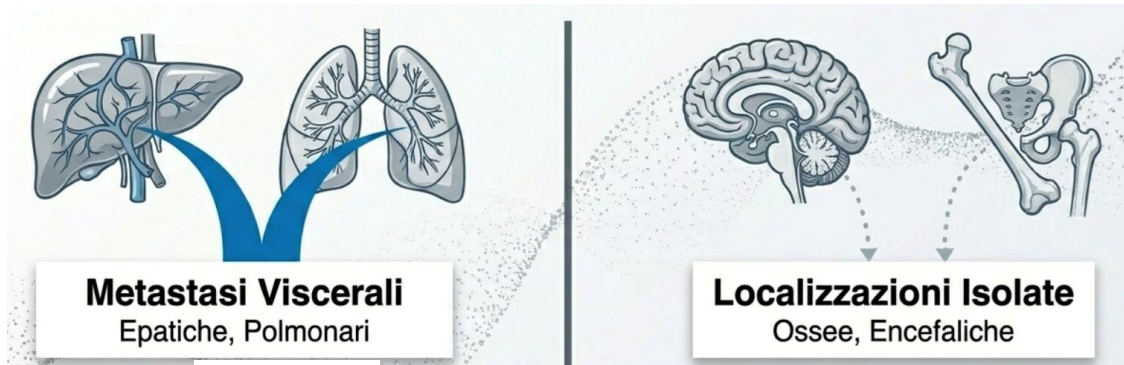
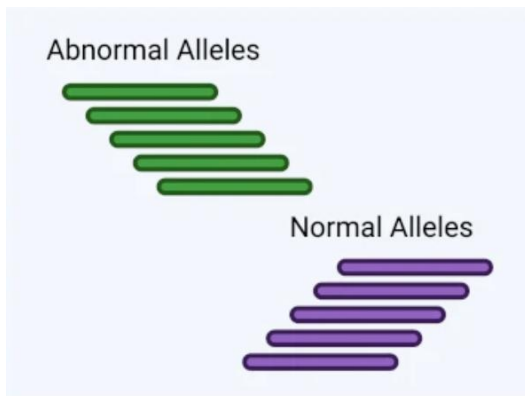
Parametri	dPCR (PCR Digitale)	NGS (Sequenziamento)
Copertura (Coverage)	 Solo varianti hot-spot note	 Approccio agnostico su ampie regioni
Sensibilità / LOD	 Eccellente 0.001%-1%	 Alta 0.01%-5% con UMI
Rilevazione Fusioni e CNV	 Sub-ottimale	 Alta processività
Valutazione Tumor Fraction	 No	 Sì, con grandi pannelli
Turnaround Time (TAT)	 Poche ore	 ~7 giorni
Costi	 < 200 €	 > 800-1200 €

La dPCR offre velocità, alta sensibilità a basso costo per mutazioni già codificate. L'NGS è l'approccio indispensabile per ampie profilazioni, identificazione di meccanismi di resistenza complessi e ricerca agnostica.

## Metodologie NGS a confronto

Parametro	Amplicon-based (es. TAm-Seq, Safe-SeqS)	Hybrid capture-based
Input di DNA	Richiede quantità inferiori	Richiede quantità maggiori
Costi & Efficienza	Più economico, alti tassi "on-target"	Costi superiori, ma copertura più uniforme
Artefatti PCR	Maggiore probabilità	Rileva meno duplicati PCR (ideale per campioni ctDNA)
Caso d'Uso Ideale	Esperimenti su piccola scala, target mirati	Grandi pannelli (CGP), Whole-Exome Sequencing (WES)

## variant allele fraction (VAF)



### Carico Tumorale

La VAF correla direttamente con la massa tumorale complessiva presente nell'organismo.



### Volume Metastatico

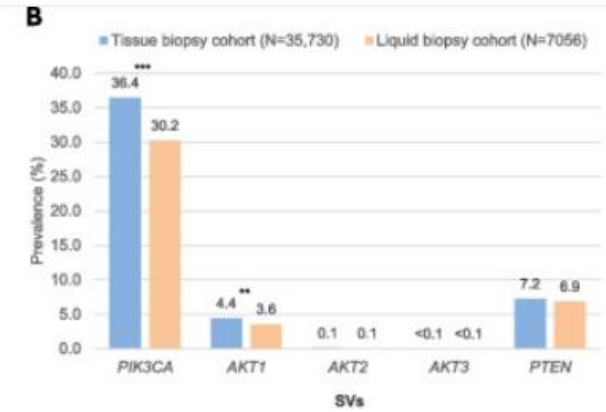
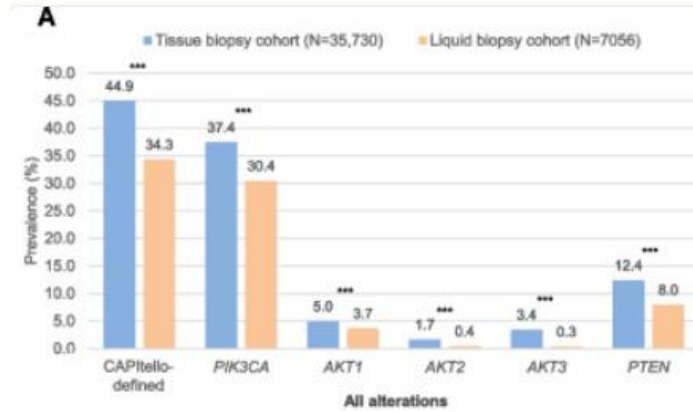
L'estensione e il numero delle sedi secondarie influenzano la concentrazione di DNA rilasciato.



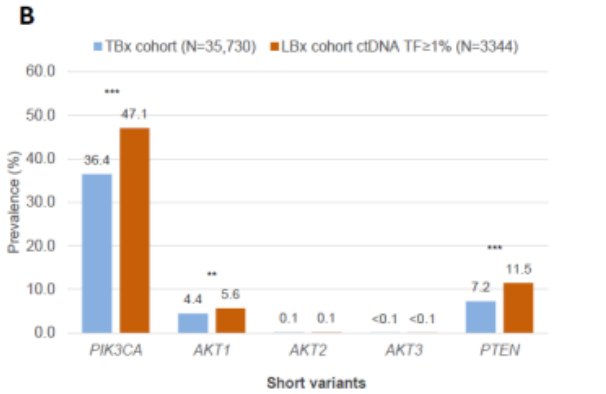
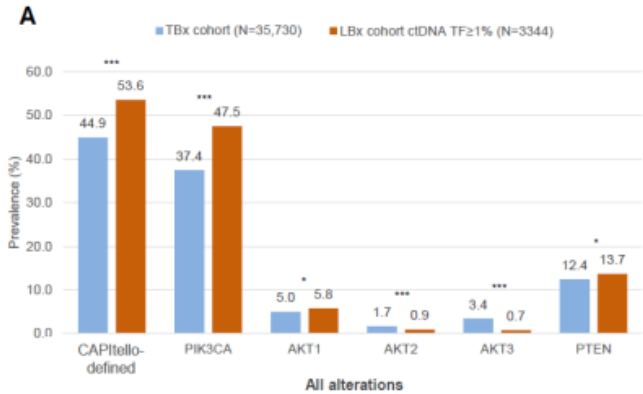
### Turn-over Cellulare

Il tasso di apoptosi e necrosi cellulare determina lo "shedding" (rilascio) di frammenti nel plasma.

(A) all pathogenic alterations and (B) pathogenic SVs in the tissue and liquid biopsy cohorts



TF ≥1% cohorts



# Utilità clinica del monitoraggio in tempo reale

## Studio PADA-1

### Paradigma Tradizionale

Attendere la progressione clinica e radiologica (RECIST) per modificare l'impianto terapeutico.  
Un approccio che interviene su una malattia già macroscopicamente resistente.



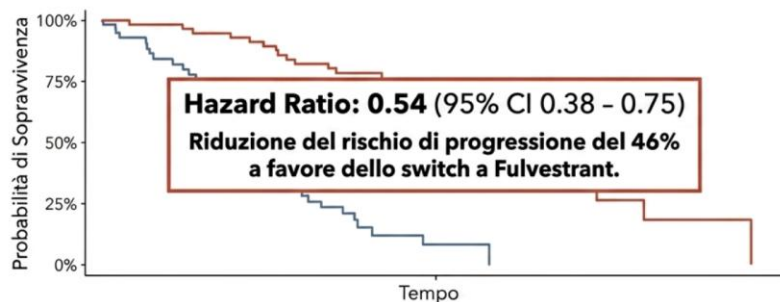
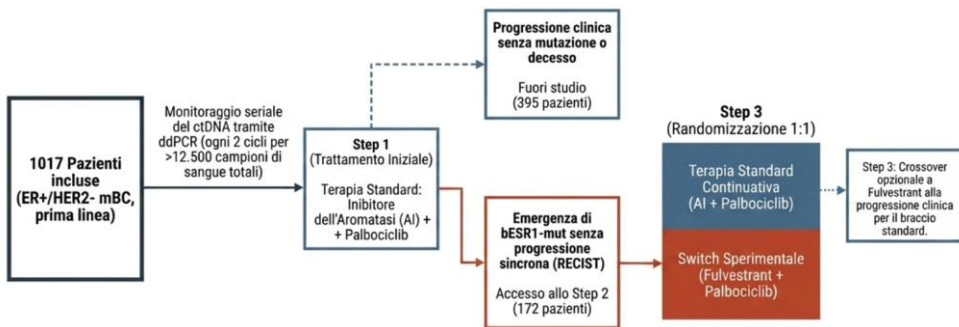
Progressione Clinica

### Paradigma PADA-1

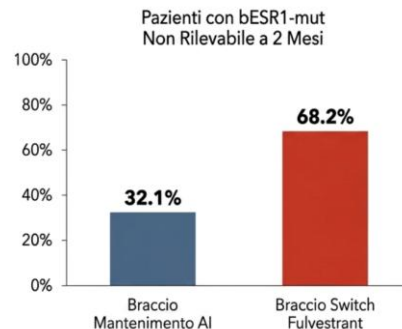
Monitoraggio Monitoraggio Monitoraggio Monitoraggio Monitoraggio

Intercettazione

Monitoraggio seriale in real-time tramite droplet digital PCR (ddPCR).  
Identificazione precoce dei cloni mutati ed esecuzione di uno switch terapeutico mirato (verso i SERD) nella finestra molecolare pre-clinica.







## Dati PFS 5.9m vs 12.8m



# Studio PADA-1







## Matrice Diagnostica: Fattori Associati all'Insorgenza di bESR1-mut

PADA-1 ha permesso per la prima volta di identificare i determinanti clinici e patologici basali che predispongono all'insorgenza della mutazione in corso di terapia con AI e Palbociclib.

Sede Metastatica	Assetto Recettoriale	Fattori Demografici	Fattori Sistemici
 <p><b>Metastasi Ossee:</b> Forte associazione. (Solo osso: OR 2.7   Osso + altri siti: OR 2.1). Il microambiente osseo potrebbe favorire la selezione dei cloni mutati.</p>	 <p><b>Espressione ER:</b> Positività correlata. Un incremento del 10% nell'espressione di ER (IHC) aumenta il rischio (OR 1.1). Indica una marcata dipendenza del tumore dal signalling recettoriale.</p>	 <p><b>Età Anagrafica:</b> Le pazienti più giovani presentano un rischio maggiore di comparsa della mutazione (OR 1.2 per ogni decade di diminuzione).</p>	 <p><b>Livelli di LDH:</b> Un livello elevato di lattato deidrogenasi al basale (OR 1.6) correla con una maggiore incidenza, indicando un potenziale legame con il burden tumorale o il metabolismo aggressivo.</p>

Le pazienti con metastasi viscerali e intervallo libero da malattia <3 anni mostravano un rischio maggiore di progressione clinica sincrona (impossibilità di intercettazione precoce).

## Sfide urgenti

VAF < 0.5%	LOD / NGS 	Falsi Neg ✗	Standardizzazione validazione ortogonale (Real Time PCR, ddPCR) 
CHIP	Età, fumo, emopoiesi clonale 	Falsi Pos ✓	Analisi Buffy Coat / PBMNC 
LB negative	Low-shedding, TF detection 	Falsi Neg ✗	Triage Reflex su FFPE 

Grazie!