

PREVENZIONE

Prevenzione e diagnosi precoce dei tumori

Negli ultimi anni la ricerca in campo oncologico si è incentrata sullo sviluppo di tecniche di biologia molecolare sempre più sensibili nel monitorare i meccanismi responsabili dello sviluppo e della diffusione della patologia tumorale, con l'obiettivo di migliorare la cosiddetta "oncologia di precisione", finalizzata ad identificare markers predittivi e utili nel potenziamento di diagnosi e trattamento dei tumori [1,2]

IN QUESTO CONTESTO va' a collocarsi la biopsia liquida (LB) che va inteso come un potente strumento per monitorare in tempo reale lo stato molecolare della patologia tumorale, superando i limiti della biopsia tissutale classica [3]. La Nci Dictionary of Cancer Terms definisce la biopsia liquida un "test basato sul prelievo di un campione di sangue in cui si ricercano cellule tumorali circolanti (CTCs) o frammenti di Dna tumorale in circolo" (<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/liquid-biopsy>). Attualmente campo di applicazione della biopsia liquida è stato esteso agli acidi nucleici circolanti contenuti negli esosomi e anche alle informazioni biologiche contenute nelle piastrine correlate al tumore. Pertanto, sebbene la biopsia liquida venga effettuata più comunemente sul sangue, essa può essere eseguita anche su altri fluidi corporei come urina, saliva, liquor o liquido pleurico [4, 5].

I componenti principali della biopsia liquida si riferiscono all'analisi delle cellule tumorali circolanti (CTCs), *Circulating Tumor Dna* (ctDna) e *Circulating Tumor Rna* (ctRna), esosomi, microvescicole e piastrine, tutti elementi rilasciati in circolo nel sangue periferico dal tumore primitivo o dai depositi metastatici. [6] Le CTCs sono cellule tumorali che, attivamente o passivamente, si disseminano in vari modi dalla massa tumorale originaria, fino ad arrivare alla localizzazione a distanza, adattandosi a tutti i microambienti [3].



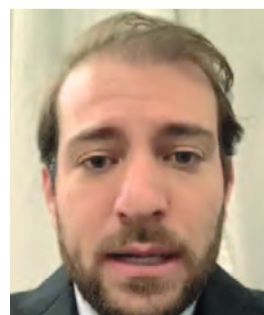
Biopsia liquida, un nuovo strumento concreto e sostenibile

Nonostante le CTCs siano estremamente rare e limitate rispetto alle altre cellule ematiche (1-10 CTCs/10⁶ cellule ematiche in 1 mL di sangue), lo sviluppo di tecniche molecolari sempre più accurate, in particolare di immunocitochimica e di ibridazione fluorescente in situ, ha permesso di individuare proteine di superficie e caratteristiche morfologiche che rendono possibile l'isolamento di tali cellule. Esse contengono importanti informazioni come tendenza alla metastatizzazione, resistenza o maggiore suscettibilità alle terapie, aprendo nuovi scenari su diagnosi, trattamento e resistenza ai trattamenti. Elevato numero di CTC è associato ad una minore risposta al trattamento, con una overall survival ridotta, malattia più aggressiva e progression free survival inferiore [7, 8]. I biomarkers della LB, quindi non solo esosomi, ma microvescicole, esosomi di maggiori dimensioni, trasportatrici di messaggi cellulari, *Circulating Tumor Dna* (ctDna) e *Circulating Tumor Rna* (ctRna) si occupano del trasporto di informazioni di segnale relative ai processi di metastatizzazione e replicazione delle cellule tumorali. Questi biomarkers, quindi, possono rivelarsi utili nel monitoraggio in tempo reale dello stato di malattia, rappresentando uno strumento molto vantaggioso per pazienti in terapia con rischio di ripresa di malattia [9, 10].

I *Cell Free circulating Dna* (cfDna) e *Cell free circulating free Rna* (cfRna) sono acidi nucleici che possono essere rilasciati passivamente da cellu-



ENRICO VIZZA
Direttore Uoc di Ginecologia Oncologica, Dipartimento di Chirurgia Oncologica, Istituto Nazionale Tumori "Regina Elena" Roma



ANDREA GIANNINI
Specialista in Ginecologia ed Ostetricia, Dottorando in Medicina Traslazionale e Oncologia Sapienza Università di Roma

le necrotiche. I pazienti con tumori maligni hanno una percentuale di cf Dna maggiore rispetto ai pazienti con tumori benigni [0- 65], che aumenta con l'avanzare dello stadio di malattia [7]. I ct Dna, a singola o doppia elica, possiedono molte caratteristiche tumore-associate, come differenti zone di metilazione o sequenza nucleotidiche, sovrapponibili alle cellule tumorali. La biopsia liquida basata sul ct Dna sembra essere maggiormente sensibile e avere maggiori correlazioni cliniche rispetto agli altri biomarkers.

La biopsia liquida ha inoltre la potenzialità di migliorare la diagnosi precoce e di implementare la potenza dei test diagnostici, con un'analisi costo-efficacia estremamente positiva e minima invasività. In questo campo l'analisi del ct Dna è la più promettente.

Attualmente le biopsie liquide trovano applicazioni nella clinica di diversi tumori solidi.

Una recente metanalisi ha infatti concluso che l'isolamento nel sangue del ct Dna ha una buona specificità- seppur insufficiente sensibilità- nel diagnosticare il cancro del colon retto; [11] vi sono inoltre emergenti evidenze sul fatto che la biopsia liquida del ct Dna possa diventare un' arma in più nella diagnosi precoce dei tumori del colon allo stadio iniziale [12,13] Alterazioni del mRNA di pazienti con adenomi precancerosi o affetti da tumore del colon sono stati riportati in campioni di sangue e feci, con concentrazioni di tali cellule significativamente più alte rispetto alla contro-

PREVENZIONE



parte sana [14,15].

Pazienti affetti da tumore del polmone hanno una concentrazione di cf Dna maggiore nel sangue, e più è alta tale concentrazione peggiore è la prognosi [16,17]. Nei pazienti con carcinoma polmonare il Dna tumorale circolante può essere un'alternativa per monitorare la risposta in tumori con mutazione del gene Egfr e per individuare precocemente i meccanismi di resistenza acquisita come ad esempio la mutazione T790M, che compare in più del 40% dei pazienti trattati con inibitori specifici di Egfr [18].

Tra i tumori ginecologici, la biopsia liquida trova oggi maggiore applicazione in quello dell'ovaio. In particolare, l'importanza clinica di CTC e ct Dna, in termini di progressione libera da malattia e risposta alla terapia, è stato notevolmente approfondito nelle ultime decadi [19,20,21]. Vi sono inoltre evidenze emergenti sul ruolo degli esosomi: essi hanno un ruolo insostituibile nei processi di tumorigenesi e progressione di malattia. Infatti, le vescicole di membrana contengono molecole bioattive che influenzano crescita, invasione, metastatizzazione e resistenza alla terapia delle cellule tumorali, tramite interazioni con la matrice intracellulare, cellule endoteliali e fibroblasti. In particolare, l'attenzione si è poi focalizzata sulla connessione tra gli esosomi e la resistenza alla terapia. Infatti, è stato dimostrato che le cellule del tumore ovarico trattate con cisplatino rilasciano altissime concentrazioni di esosomi, inducendo il fenomeno della resistenza al chemioterapico [22].

La proteina annessina 3, contenuta negli esosomi, è iperespressa nelle pazienti platino resistenti [23]. Gli esosomi come biomarkers della biopsia liquida, inoltre, sono più numerosi nel sangue ri-

spetto, ad esempio, alle CTC, quindi più facili da isolare, diventando un utile strumento clinico, dando molteplici informazioni sull'andamento del tumore [24].

La biopsia liquida trova campo di applicazione anche nel tumore della mammella; in particolare le lesioni mammarie precancerose, come il carcinoma duttale in situ, possono essere accompagnate da disseminazione di cellule tumorali [25]. Infatti, CTC sono state isolate in circa il 20-30% delle pazienti senza disseminazione metastatica e sono predittive di un outcome clinico peggiore. Nel tumore della mammella, la biopsia liquida viene inoltre utilizzata per monitorare lo stato di malattia. Il trial tedesco Success, ha valutato la persistenza delle CTC in pazienti con malattia non metastatica, dopo terapia adiuvante, affermano la tendenza a sviluppare meccanismi di resistenza [26].

Per anni la ricerca di base in oncologia si è concentrata prevalentemente sui meccanismi che governano e facilitano il processo di diffusione metastatica e la diffusione extra organo della malattia, con la biopsia liquida la ricerca ci offre invece la nuova possibilità di uno strumento concreto e sostenibile nel campo della prevenzione e alla diagnosi precoce dei tumori in fase anche preclinica.

PER SAPERNE DI PIÙ

- 1 Venesio, T.; Siravegna, G.; Bardelli, A.; Sapino, A. Liquid biopsies for monitoring temporal genomic heterogeneity in breast and colon cancers. *Pathobiology* 2018, 85, 146-154
- 2 Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011, 144, 646-674.
- 3 Imamura, T.; Komatsu, S.; Ichikawa, D.; Kawaguchi, T.; Miyamae, M.; Okajima, W.; Ohashi, T.; Arita, T.; Konishi, H.; Shiozaki, A.; et al. Liquid biopsy in patients with pancreatic cancer: Circulating tumor cells and cell-free nucleic acids. *World J. Gastroenterol.* 2016, 22, 5627
- 4 Pantel, K.; Alix-Panabières, C. Circulating tumour cells in cancer patients: Challenges and perspectives. *Trends Mol. Med.* 2010, 16, 398-406
- 5 Siravegna, G.; Marsoni, S.; Siena, S.; Bardelli, A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2017, 14, 531-548.
- 6 Wang, J.; Chang, S.; Li, G.; Sun, Y. Application of liquid biopsy in precision medicine: Opportunities and challenges. *Front. Med.* 2017, 11, 522-527.
- 7 Joosse, S.A.; Gorges, T.M.; Pantel, K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol. Med.* 2015, 7, 1-11
- 8 Pantel, K.; Alix-Panabières, C. Functional studies on viable circulating tumor cells. *Clin. Chem.* 2016, 62, 328-334
- 9 Czeiger, D.; Shaked, G.; Eini, H.; Vered, I.; Belochitski, O.; Avriel, A.; Ariad, S.; Douvdevani, A. Measurement of circulating cell-free DNA levels by a new simple fluorescent test in patients with primary colorectal cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* 2011, 135, 264-270.
- 10 Otsuji, K.; Sasaki, T.; Tanaka, A.; Kunita, A.; Ikemura, M.; Matsusaka, K.; Tada, K.; Fukayama, M.; Seto, Y. Use of droplet digital PCR for quantitative and automatic analysis of the HER2 status in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 2017, 162, 11-18
- 11 Gold, B.; Cankovic, M.; Furtado, L.V.; Meier, F.; Gocke, C.D. Do circulating tumor cells, exosomes, and circulating tumor nucleic acids have clinical utility? A report of the association for molecular pathology. *J. Mol. Diagn.* 2015, 17, 209-224.
- 12 Bi, F.; Wang, Q.; Dong, Q.; Wang, Y.; Zhang, L.; Zhang, J. Circulating tumor DNA in colorectal cancer: Opportunities and challenges. *Am. J. Transl. Res.* 2020, 12, 1044-1055.
- 13 Wang, X.; Shi, X.-Q.; Zeng, P.-W.; Mo, F.-M.; Chen, Z.-H. Circulating cell free DNA as the diagnostic marker for colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2018, 9, 24514-24524
- 14 Link, A.; Balaguer, F.; Shen, Y.; Nagasaka, T.; Lozano, J.J.; Richard Boland, C.; Goel, A. Fecal microRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2010, 19, 1766-1774.
- 15 Wang, Y.; Chen, Z.; Chen, W. Novel circulating microRNAs expression profile in colon cancer: A pilot study. *Eur. J. Med. Res.* 2017, 22.
- 16 Gautschi O, Bigosch C, Huegli B, et al. Circulating deoxyribonucleic acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4157-4164.
- 17 Tissot C, Toffart A-C, Villar S, et al. Circulating free DNA concentration is an independent prognostic biomarker in lung cancer. *Eur Respir J* 2015; 46: 1773-1780.
- 18 Diehl F, Li M, He Y, et al. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods* 2006; 3: 551-559.
- 19 Q. Zhou, W. Li, B. Leng, W. Zheng, Z. He, M. Zuo, A. Chen, Circulating cell free DNA as the diagnostic marker for ovarian Cancer: a systematic review and meta- analysis, *PLoS One* 11 (2016) e0155495.
- 20 X. Cheng, L. Zhang, Y. Chen, C. Qing, circulating cell-free DNA and circulating tumor cells, the «liquid biopsies» in ovarian cancer, *J Ovarian Res* 10 (2017) 75.
- 21 L. Giannopoulou, S. Kasimir-Bauer, E.S. Lianidou, Liquid biopsy in ovarian cancer: recent advances on circulating tumor cells and circulating tumor DNA, *Clin. Chem. Lab. Med.* 56 (2018) 186-197.
- 22 P. Samuel, L.A. Mulcahy, F. Furlong, H.O. McCarthy, S.A. Brooks, M. Fabbri, R.C. Pink, D.R.F. Carter, Cisplatin induces the release of extracellular vesicles from ovarian cancer cells that can induce invasiveness and drug resistance in bystander cells, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 373 (2018) 20170065.
- 23 J. Yin, X. Yan, X. Yao, Y. Zhang, Y. Shan, N. Mao, Y. Yang, L. Pan, Secretion of annexin A3 from ovarian cancer cells and its association with platinum resistance in ovarian cancer patients, *J. Cell. Mol. Med.* 16 (2012) 337-348.
- 24 M. Alunni-Fabbroni, M.T. Sandri, Circulating tumour cells in clinical practice: methods of detection and possible characterization, *Methods (San Diego, Calif.)* 50 (2010) 289-297.
- 25 Husemann Y, Geigl JB, Schubert F et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer cell* 2008 13:58-68
- 26 Rack B, Schindlbeck C, Juckstock J et al. Circulating tumor cells predict survival in early average- to- high risk breast cancer patients. *J Natl CancerInst* 2014; 106:dju066