

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

---

Dottorato di ricerca in Oncologia e Patologia Sperimentale

Progetto Nr.2 – Patologia Sperimentale

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale: 06/A2

Settore Scientifico disciplinare: MED/05

**MARCATORI MOLECOLARI CIRCOLANTI:  
QUALE RUOLO NEI PAZIENTI  
CON TUMORI SOLIDI?**

**Dott.ssa Elisa Capizzi**

*Coordinatore:*

**Chiar.mo Prof.  
Sandro Grilli**

*Relatore:*

**Chiar.mo Prof.  
Massimo Derenzini**

---

Esame finale anno 2012



<b>INTRODUZIONE</b>	<b>5</b>
<b>IL PROCESSO METASTATICO</b>	<b>7</b>
<b>CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI</b>	<b>10</b>
CARATTERISTICHE BIOLOGICHE DI CTC E DTC	11
SIGNIFICATO E RILEVANZA CLINICA DELLE CTC	12
METODICHE PER L'INDIVIDUAZIONE DELLE CTC	13
<b>DNA LIBERO PLASMATICO</b>	<b>19</b>
ORIGINE DEL DNA LIBERO	19
SIGNIFICATO CLINICO DEL FPDNA	21
<b>MARCATORI SIERICI</b>	<b>23</b>
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>25</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>27</b>
<b>SELEZIONE DELLE PAZIENTI</b>	<b>27</b>
1 PAZIENTI CON CARCINOMA DELLA MAMMELLA METASTATICO	27
2 PAZIENTI CON CARCINOMA DELLA MAMMELLA LOCALIZZATO O LOCALMENTE AVANZATO (STUDIO ARIANNA 01)	28
3 PAZIENTI CON CARCINOMA OVARICO AVANZATO (ARIANNA 02)	29
<b>RACCOLTA DEI CAMPIONI</b>	<b>30</b>
<b>QUANTIFICAZIONE DEL DNA LIBERO PLASMATICO (FPDNA)</b>	<b>31</b>
<b>ISOLAMENTO DELLE CTC</b>	<b>32</b>
ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE DA BUFFY COAT	32
ARRICCHIMENTO IMMUNOMAGNETICO DI CTC DA BUFFY COAT	33
ESTRAZIONE MAGNETICA DI mRNA	33
SINTESI DI cDNA (RT-PCR)	34
REAL TIME PCR	35
<b>QUANTIFICAZIONE DEI RISULTATI</b>	<b>36</b>
QUANTIFICAZIONE RELATIVA PER L'ANALISI DEI MARCATORI DA BUFFY COAT	36
QUANTIFICAZIONE ASSOLUTA PER L'ANALISI DI TUTTI I MARCATORI DOPO ARRICCHIMENTO IMMUNOMAGNETICO	37
<b>ANALISI STATISTICA</b>	<b>40</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>41</b>
<b>DETERMINAZIONE DEL CUT-OFF DI NORMALITA'</b>	<b>41</b>
<b>1 PAZIENTI CON CARCINOMA DELLA MAMMELLA METASTATICO</b>	<b>42</b>
1.1 QUANTIFICAZIONE DEL DNA LIBERO PLASMATICO	42
1.2 QUANTIFICAZIONE DELLE CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI	43
1.3 CARATTERISTICHE CLINICHE E ISTOLOGICHE	44
1.4 FPDNA, CTC, ISTOLOGIA E CLINICA	45
<b>2 PAZIENTI CON CARCINOMA DELLA MAMMELLA LOCALIZZATO-LOCALMENTE AVANZATO (ARIANNA 01)</b>	<b>47</b>
2.1 QUANTIFICAZIONE DEL DNA LIBERO PLASMATICO	47
2.2 QUANTIFICAZIONE DELLE CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI	48

2.3	CARATTERISTICHE CLINICHE E ISTOLOGICHE	49
2.4	FPDNA, CTC, ISTOLOGIA E CLINICA	50
<b>3</b>	<b>PAZIENTI CON CARCINOMA OVARICO AVANZATO (ARIANNA 02)</b>	<b>54</b>
3.1	QUANTIFICAZIONE DEL DNA LIBERO PLASMATICO	54
3.2	QUANTIFICAZIONE DELLE CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI	55
3.3	CARATTERISTICHE CLINICHE E ISTOLOGICHE	55
3.4	FPDNA, CTC, ISTOLOGIA E CLINICA	56
<b><u>DISCUSSIONE</u></b>		<b>59</b>
1	PAZIENTI CON CARCINOMA DELLA MAMMELLA METASTATICO	60
2	PAZIENTI CON CARCINOMA DELLA MAMMELLA LOCALIZZATO O LOCALMENTE AVANZATO	62
3	PAZIENTI CON CARCINOMA DELL'OVAIO AVANZATO	63
CONSIDERAZIONI METODOLOGICHE		65
<b><u>CONCLUSIONI</u></b>		<b>69</b>
<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>		<b>71</b>
<b><u>LAVORI PRODOTTI DURANTE IL PERIODO DI DOTTORATO</u></b>		<b>77</b>

## INTRODUZIONE

I tumori solidi sono una delle principali cause di morbidità e mortalità in tutto il mondo, primariamente a causa del fallimento della precoce individuazione della malattia neoplastica metastatica e di un efficace trattamento.

Negli ultimi anni, gli sforzi messi in atto per la ricerca di nuovi farmaci oncologici si sono concentrati soprattutto sulle terapie *target*, per il cui successo è fondamentale selezionare correttamente e precocemente i pazienti che potrebbero trarre reale beneficio dal trattamento. Tale selezione è legata all'identificazione di specifici marcatori molecolari predittivi di risposta alla terapia su campioni tissutali. Tuttavia, in alcuni casi i campioni tissutali possono non essere reperibili, o non essere più disponibili per esaurimento del materiale o ancora non essere adeguati a rappresentare la malattia metastatica insorta a diversi anni di distanza dal tumore primitivo. In tutti questi casi c'è urgente necessità di avere a disposizione un "tessuto diagnostico surrogato" per l'analisi molecolare. Ed è proprio in questo contesto che in tempi recenti è tornata fortemente in prima linea la ricerca sui marcatori circolanti.

I marcatori circolanti, infatti, essendo facilmente reperibili nel sangue periferico, possono rappresentare una cosiddetta "biopsia liquida" in grado di fornire informazioni in tempo reale sull'evoluzione della malattia del singolo paziente.

Oltre ai classici marcatori sierici, da anni inseriti nella routine oncologica, sono oggi disponibili metodiche per analizzare nuovi marcatori molecolari, tra cui le cellule tumorali o gli acidi nucleici circolanti, il cui esatto ruolo deve però ancora essere ben definito.



## IL PROCESSO METASTATICO

Le proprietà metastatiche delle cellule tumorali sono state estesamente studiate fin dagli anni '70. Le prime osservazioni, basate su esperimenti con linee cellulari di melanoma inoculate in topi, portarono a ipotizzare un modello di cascata metastatica basato sull'acquisizione della capacità metastatizzante solo nelle ultime fasi della tumorigenesi, grazie all'accumulo di mutazioni somatiche. Secondo questo modello, quindi, i focolai metastatici deriverebbero da sottopopolazioni di cellule del tumore primario.[1] Studi successivi, condotti su modelli di metastatizzazione spontanei piuttosto che su cellule in coltura, ipotizzarono invece che le cellule metastatiche fossero una rappresentazione random delle cellule cancerose primarie, tutte dotate della capacità di dar luogo a focolai metastatici.[2] Furono poi proposti ulteriori modelli, come quello della "eterogeneità dinamica" ma, alla fine, il modello di cascata metastatica per lungo tempo accettato è stato quello "classico".[1] Tale modello, basato sull'assunzione che le cellule tumorali coinvolte nella formazione di loci neoplastici secondari siano solo una piccola parte delle cellule che formano il tumore primario e che i fenomeni metastatici si verifichino solo una volta raggiunti gli stadi più avanzati della malattia, è stato recentemente rimesso in discussione dai risultati ottenuti in studi di espressione genica condotti in carcinomi di vario tipo.[3] In particolare, studi condotti nel carcinoma della mammella, hanno portato nuove importanti osservazioni, tra cui:

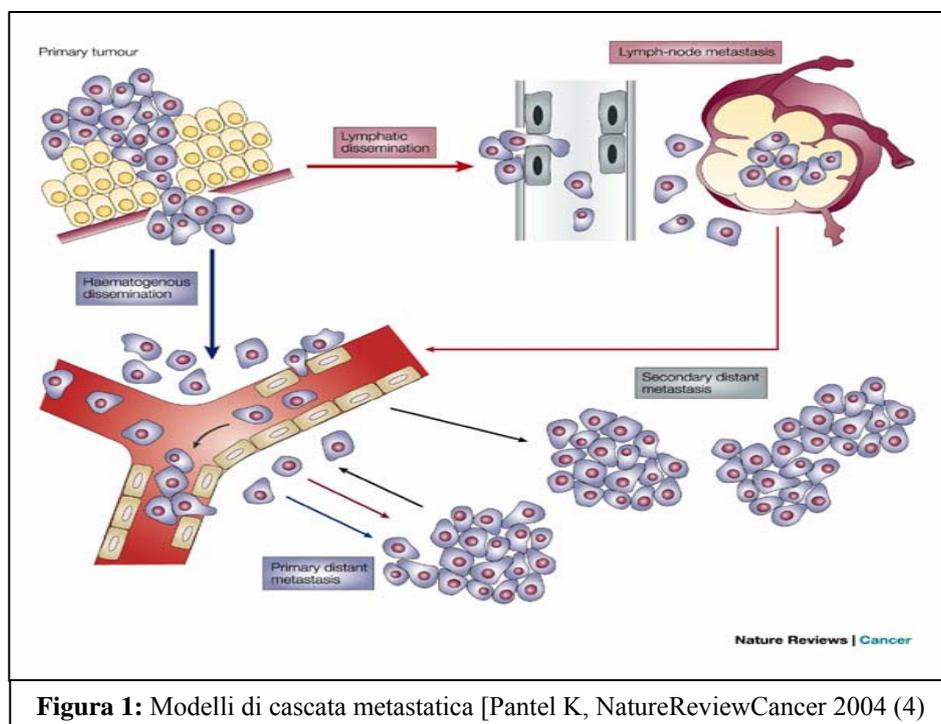
- un 20-30% delle pazienti presenta metastasi a distanza in assenza di precedenti metastasi linfonodali [4];
- tutte o la maggior parte delle cellule del tumore primitivo possiedono un profilo di espressione genica con potenziale metastatico fin dai primi stadi della malattia [5]
- esistono *pathways* di segnalazione diversi per la diffusione ematica e linfatica [6]
- la disseminazione sembra essere un evento molto precoce nella tumorigenesi [4,6]

Queste evidenze hanno portato alla descrizione di nuovi e complementari modelli di cascata metastatica, in grado di attribuire maggior enfasi alle diverse vie di disseminazione intraprese dalle cellule neoplastiche.[6] (vedi figura 1)

Nel primo modello, le cellule cancerose si distaccano dal tumore primario per raggiungere i linfonodi o il circolo sanguigno già durante gli stadi precoci della crescita tumorale. Tuttavia, mentre la maggior parte delle cellule tumorali disseminate ai linfonodi regionali è in grado di proliferare e formare metastasi solide, le cellule che sono state immesse nel torrente circolatorio muoiono o rimangono dormienti. In seguito, con il progredire della malattia, le cellule tumorali presenti nelle metastasi linfonodali possono diffondere ad altri organi attraverso il circolo ematico e

formare metastasi a distanza. In questo modello, si ritiene che le cellule tumorali, inizialmente incapaci di sopravvivere nel torrente circolatorio, acquisiscano la capacità di formare metastasi a distanza attraverso un processo di selezione che avviene nei linfonodi. Secondo questo modello, quindi, la formazione di metastasi a distanza risulta strettamente dipendente dalla presenza di metastasi ai linfonodi.

Nel secondo modello, invece, le cellule cancerose sono in grado di entrare con alta frequenza nel circolo ematico e, attraverso questo, di raggiungere organi a distanza, sede di metastasi secondarie. In questo caso quindi, non sembra essere necessario il passaggio attraverso i linfonodi regionali, per cui potrebbero trovare una spiegazione anche quei casi in cui si riscontrano metastasi a distanza in pazienti che non presentano proliferazione maligna a livello dei linfonodi.



**Figura 1:** Modelli di cascata metastatica [Pantel K, NatureReviewCancer 2004 (4)]

Nelle pazienti con carcinoma della mammella, la disseminazione ematica sembra essere un evento molto precoce, tanto che le cellule tumorali reperibili nel midollo osseo possono essere considerate cellule tumorali “immature”, dotate di una breve emivita e non proliferanti. Tuttavia, secondo modelli sperimentali, le cellule tumorali disseminate possono cominciare a moltiplicarsi e ad acquisire mutazioni genetiche diverse dal tumore primario, formando metastasi solide.

In entrambi i modelli può poi verificarsi una seconda fase di disseminazione ematica a partire dalle eventuali metastasi formatesi a livello di organi a distanza o linfonodi regionali. Questa teoria fornisce quindi una valida spiegazione al perché si ritrovino ancora cellule citocheratina-positivo nel sangue periferico di alcune pazienti con carcinoma della mammella, anche dopo anni dalla rimozione chirurgica della massa tumorale primaria. Inoltre, le cellule tumorali circolanti che si

possono formare in seconda battuta, sembrano essere persino più aggressive di quelle che originano le prime metastasi, probabilmente perchè già selezionate per sopravvivere al passaggio nel circolo ematico e in nuovi organi bersaglio. Questi modelli necessitano tuttavia di ulteriori conferme in ambito clinico e da studi di caratterizzazione genica.

Allo stato attuale, comunque, i modelli di cascata metastatica proposti, uniti ai dati ottenuti da studi di espressione genica, suggeriscono di considerare il tumore della mammella, fin dal suo esordio, non solo una malattia locale ma bensì sistemica.[7]

## **CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI**

In letteratura, è possibile osservare un'ampia gamma di definizioni per le cellule metastatiche circolanti nel sangue tuttavia, la terminologia corretta per indicare le cellule tumorali che si trovano nel midollo osseo è cellule tumorali disseminate o DTC, mentre per le cellule presenti nel sangue periferico è cellule tumorali circolanti o CTC. [8]

Secondo i nuovi modelli di cascata metastatica [3], le CTC sono quelle cellule che si dissociano dalla massa tumorale primaria ed accedono al circolo sistemico tramite l'extravasazione diretta in vasi sanguigni o dopo il transito nel sistema linfatico.

L'isolamento di tali cellule fu dimostrato già nella seconda metà del 1900 dal gruppo di ricerca di Engell e Roberts che scoprirono cellule tumorali in campioni di sangue provenienti da diversi pazienti ammalati con carcinomi della mammella, dell'ovaio, del polmone, della prostata e dello stomaco. [9]

Quale sia il destino che attende le cellule tumorali che entrano in circolo è ancora oggetto di studio; è noto infatti come non tutte le cellule tumorali che si distaccano dalla massa primaria siano effettivamente in grado di impiantarsi in organi secondari in quanto, nella circolazione sistemica, esse sono soggette sia a fenomeni di immunomodulazione sia a forze di pressione emodinamica che tendono ad eliminarle.

Studi eseguiti su modelli animali, per indagare la progressione metastatica nel fegato e nel polmone, mostrano come i passaggi meno efficienti nella sopravvivenza delle cellule neoplastiche non siano quelli più precoci, che prevedono la sopravvivenza in circolo, l'arresto e la fuoriuscita dai vasi delle cellule neoplastiche, bensì quelli più tardivi, che riguardano il fallimento della crescita delle cellule solitarie e delle micrometastasi (processo noto come inefficienza metastatica).[10]

I meccanismi di dinamica e selezione delle cellule neoplastiche circolanti in relazione alla loro capacità di invasione e metastasi sono ancora oggetto di numerosi studi.

E' noto come le dimensioni dei capillari presenti negli organi bersaglio, in particolare nel polmone e nel fegato, che sono le sedi più frequenti di metastasi, siano determinanti nell'arrestare meccanicamente le CTC presenti nel sangue, che rimangono così intrappolate nei tessuti. I capillari tissutali possiedono un diametro compreso tra 3 e 8  $\mu\text{m}$ ; tale diametro risulta essere notevolmente inferiore rispetto alle dimensioni delle CTC, che oscillano tra i 20-30  $\mu\text{m}$  di diametro. Il fattore dimensionale non è tuttavia l'unico importante nell'arresto delle cellule neoplastiche nei tessuti; altri fattori fisici, infatti, quali la pressione sanguigna presente all'interno dell'organo e la deformabilità delle CTC stesse contribuiscono alla loro stasi.

L'evidenza di piccoli gruppi di CTC nella circolazione lascia ipotizzare che esse siano in grado di sopravvivere e replicarsi durante la loro permanenza nel sangue, dando origine a “clusters” o “micrometastasi”, che risultano maggiormente predisposti all’impianto e alla crescita tumorale in organi secondari. Tuttavia, in modelli sperimentali, è stato osservato che solo il 3% delle CTC solitarie disperse nel sangue si trova in uno stato proliferativo, mentre le rimanenti CTC appaiono in uno stato di non-proliferazione e di non-apoptosi, ossia in uno stato di cosiddetta “dormienza”.[1]

Lo stato di dormienza cellulare è molto importante dal punto di vista clinico, in quanto CTC e micrometastasi dormienti in organi a distanza non hanno perso la loro capacità tumorigenica e possono quindi riprendere la crescita neoplastica non appena cessano le condizioni che le mantengono in tale stato (fenomeni di immunomodulazione, acquisizione di nuove mutazioni che ne modificano il fenotipo, scomparsa di inibitori dell’angiogenesi circolanti dopo rimozione del tumore primitivo o aumento dei fattori di crescita stimolanti la proliferazione).[11] Questo potrebbe spiegare i casi di ripresa di malattia osservati in alcuni pazienti neoplastici anche dopo molti anni dal trattamento chirurgico e/o dalla terapia oncologica specifica.

Nonostante le discussioni sui modelli metastatici, la presenza di cellule tumorali nel sangue (CTC) o nelle prime sedi di localizzazione metastatica (DTC) come ossa e midollo osseo, può fornire informazioni che possono essere clinicamente utili, essendo una prova della disseminazione tumorale. L’identificazione di CTC, infatti, è un rilevante fattore di rischio per la formazione futura di metastasi e, quindi, di prognosi infausta. Inoltre, potrebbe essere utilizzato come marker per il monitoraggio della suscettibilità al trattamento farmacologico. Infine col progredire della ricerca, probabilmente diventerà fondamentale riuscire ad identificare il genotipo e il fenotipo delle CTC e delle DTC, per ottenere informazioni rilevanti nella scelta di strategie di trattamento più mirate.

### CARATTERISTICHE BIOLOGICHE DI CTC E DTC

Quando, con la prima scoperta di cellule citocheratina-positive (CK+) nel midollo osseo, ha avuto inizio lo studio delle cellule tumorali presenti nel sangue, si è aperto anche un acceso dibattito finalizzato alla caratterizzazione biologica di CTC e DTC.[12]

Primo aspetto ad essere stato chiarito è l’origine epiteliale di queste cellule [4], seguito dalla dimostrazione della loro natura “tumorale”, evidenziata con analisi di ibridazione genomica comparativa.[13.14]

Poi ci si è chiesti se queste cellule fossero “vive o morte”, visto che generalmente le cellule epiteliali, una volta separate dal contesto del tessuto d’origine, vanno rapidamente incontro a un processo di apoptosi noto come “anoikis”. A tal proposito le CTC hanno mostrato evidenze indirette

di un' aumentata resistenza a questo processo fisiologico [15, 16] e di essere in un status di vitalità, tale da permetterne la coltivazione in vitro, anche se per breve tempo.[16]

Le CTC mostrano tuttavia una propensione maggiore all'apoptosi rispetto alle DTCs, responsabile dei *remnants* di queste cellule identificabili nel sangue di alcuni pazienti.[17]

La caratterizzazione di queste cellule dal punto di vista molecolare è invece ancora oggetto di numerosi studi, ma i primi risultati evidenziano una grande variabilità nell'espressione genica di recettori per fattori di crescita, proteasi, molecole di adesione e antigeni di istocompatibilità. [3]

### SIGNIFICATO E RILEVANZA CLINICA DELLE CTC

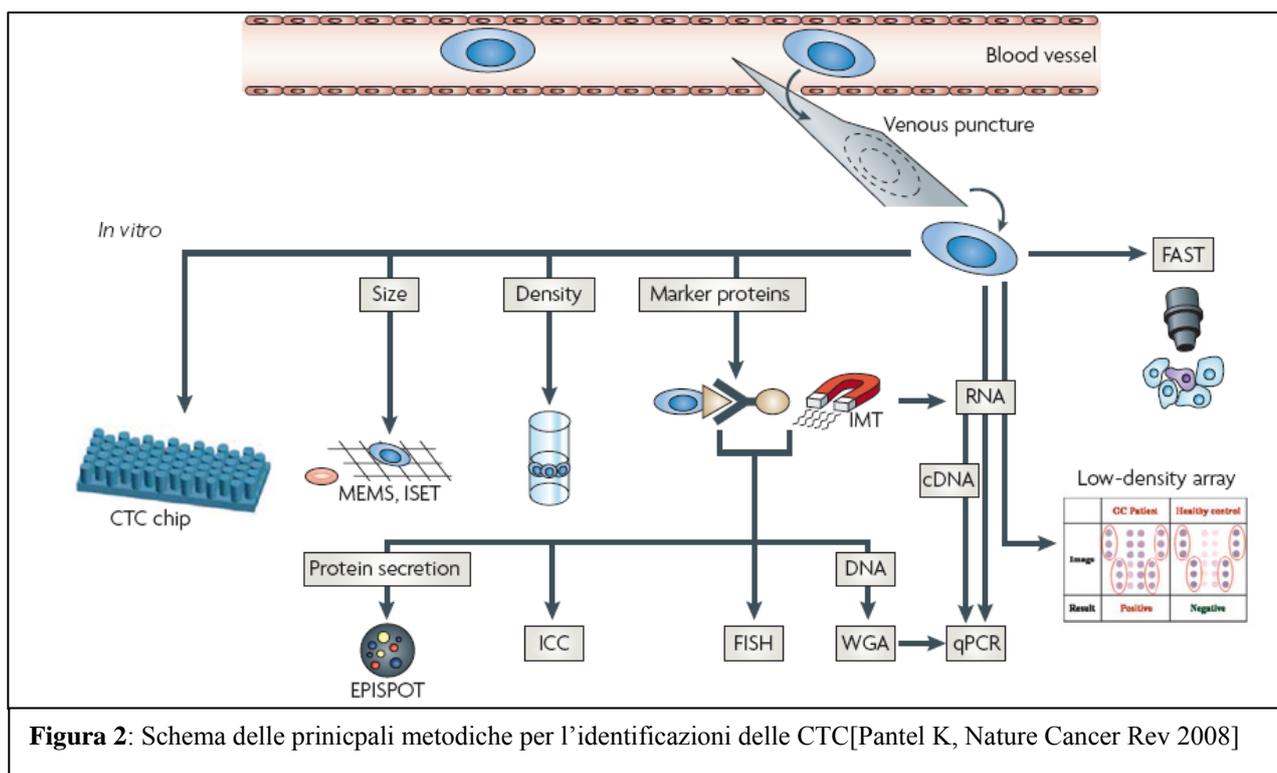
Lo sviluppo di tecniche di indagine molecolare nuove e altamente sensibili ha permesso di identificare la presenza anche di una singola cellula tumorale tra milioni di cellule sane del sangue.[12] Questo miglioramento tecnologico, a sua volta, ha permesso di fare luce su alcuni aspetti della cascata metastatica e di segnare una svolta nella diagnosi di alcuni tipi di tumore.

La presenza di cellule disseminate nel midollo osseo è stata documentata in un gran numero di carcinomi epiteliali, ed il midollo è risultato essere la principale sede di accumulo di cellule tumorali metastatiche rilasciate per via ematica, indipendentemente dalla localizzazione del tumore primario e delle metastasi a distanza. Molti studi hanno dimostrato una correlazione tra la presenza di DTCs al momento dell'intervento chirurgico di rimozione del tumore primario e la comparsa di metastasi nel periodo post-operatorio.[3] Il possibile ruolo prognostico delle DTC è tuttavia ancora dibattuto, nonostante le forti evidenze riportate in numerosi studi, soprattutto per quanto riguarda il carcinoma della mammella.[18] Ma al di là del significato, lo studio delle DTC presenta un ulteriore ostacolo, legato all'invasività della procedura di raccolta del campione. Infatti, le DTC devono essere prelevate dal midollo osseo del paziente e, nonostante l'aspirazione a livello della cresta iliaca sia una procedura clinica comune, ha comunque lo svantaggio di essere estremamente invasiva, dispendiosa in termini di tempo, sgradevole per i pazienti e difficile da standardizzare mantenendo elevata la qualità del test. E' per questo motivo che l'attenzione degli studiosi è andata via via spostandosi dalle DTC alle CTC, reperibili molto più facilmente. Sono infatti sufficienti poche decine di millilitri di sangue per condurre studi analoghi a quelli effettuati sulle DTCs.

Attualmente, il numero di studi comparativi tra DTC e CTC è molto limitato, e il significato clinico delle CTC nel sangue sembra essere ancora più incerto di quello delle DTCs nel midollo osseo.[19, 20] Tuttavia, negli ultimi anni sono stati pubblicati risultati estremamente incoraggianti sul valore prognostico della presenza di CTC nel carcinoma metastatico della mammella, del colonretto e della prostata, e tanti altri studi sono in corso di valutazione.[21, 22, 23]

A testimoniare il grande interesse mostrato dal mondo scientifico verso lo studio di questi marcatori, nel 2007 la American Society of Clinical Oncology (ASCO) ha introdotto le CTC nell'elenco dei markers tumorali del carcinoma della mammella in oggetto di revisione.[24]

### METODICHE PER L'INDIVIDUAZIONE DELLE CTC



Molte delle tecniche oggi esistenti utilizzate per il ritrovamento di CTC nel sangue periferico sono state originariamente introdotte per identificare cellule tumorali nel midollo osseo. In generale, l'identificazione e la caratterizzazione molecolare delle CTC richiede metodi altamente sensibili e specifici che di solito combinano una procedura di arricchimento, come la centrifugazione su gradiente di densità (Ficoll), la selezione immunomagnetica con l'ausilio di anticorpi diretti contro antigeni tumore-specifici (selezione positiva) o diretti contro l'antigene leucocitario comune CD45 (selezione negativa) oppure la filtrazione, prima della tecnica di determinazione vera e propria. In particolare, per la selezione immunomagnetica positiva, vengono di solito impiegati anticorpi diretti contro molecole espresse sulla superficie delle cellule epiteliali, come citocheratine (CK7, CK8, ecc) o EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), coniugati a biglie paramagnetiche. Le procedure di arricchimento si rendono necessarie a causa del basso numero di cellule tumorali reperibili nel sangue dei pazienti, inclusi quelli con malattia metastatica (in generale meno di 10 cellule/mL) [25]

Le tecniche per identificare le CTC possono essere divise in metodiche immunologiche e di analisi degli acidi nucleici.[26,27]

- Le **tecniche immunologiche** permettono di isolare e contare le singole cellule, evidenziate utilizzando colorazioni immunocitochimiche coniugate ad anticorpi monoclonali diretti verso antigeni epiteliali o tumore-specifici. Le citocheratine sono in genere il marcatore più utilizzato per l'identificazione delle CTC, anche se la perdita di espressione di questo marcatore, registrata in alcune cellule tumorali, può causare falsi negativi e l'impiego di un pannello di anticorpi diversi può causare variazioni nella specificità.

Le tecniche immunologiche hanno però il notevole vantaggio di poter caratterizzare le CTC a livello molecolare, valutando l'espressione di specifici marcatori biologici o effettuando reazioni di ibridazione in situ.

Tuttavia, con queste tecniche, lo screening di grandi volumi di materiale risulta estremamente lento, per cui sono necessari sistemi computerizzati di analisi visiva, di microscopia digitale e metodi alternativi semiautomatici, quali citometria a flusso o a laser.

Per superare molti di questi problemi, inclusi quelli di standardizzazione, è stato recentemente prodotto un sistema semi-automatizzato denominato CellSearch, che prevede una prima fase di arricchimento immunomagnetico con anticorpi diretti contro la molecola di adesione epiteliale EpCAM, e la successiva determinazione immunocitochimica delle CTC con anticorpi per le citocheratine. Tale strumento presenta innumerevoli vantaggi (vedi Tab 1), e attualmente è l'unico approvato dalla FDA per la valutazione clinica delle CTC nei carcinomi metastatici della mammella, del colonretto e della prostata.

La maggior parte degli studi recentemente pubblicati utilizza questa metodologia, per la quale sono stati definiti anche cut-off di positività accettati livello internazionale. [21, 26]

Quasi contemporaneamente al CellSearch è stata sviluppata un'altra piattaforma chiamata CTC-chip, che sta ottenendo buoni risultati. Il chip consiste in un array di micropozzetti rivestiti con anticorpi anti-EpCAM ai quali, in condizioni di flusso laminare controllato, si legano le CTC presenti nei campioni di sangue.

Alle tecniche immunocitochimiche, appartiene anche il test funzionale chiamato EPISPOT (EPithelial ImmunoSPOT). Questa metodica, dopo la deplezione delle cellule CD45 positive, valuta la presenza delle CTC (vitali) basandosi sulle proteine o i secreti rilasciati durante una coltura a breve termine di 48 ore.

- Le **tecniche basate sull'analisi degli acidi nucleici** sono quelle che mirano alla ricerca e alla caratterizzazione di mRNA tumore associato mediante RT-PCR. I prodotti di RT-PCR

possono essere separati tramite elettroforesi su gel di agarosio o, come accade più spesso, utilizzati per una reazione quantitativa mediante Real-Time PCR.

La grande sensibilità delle metodiche molecolari, ha fatto emergere il problema dei falsi positivi la cui sorgente è spesso di difficile determinazione perché possono influire diversi fattori, tra cui:

1. Utilizzo di un marcatore che non sia specifico per il tumore: è stato ipotizzato che l'utilizzo di un *target* che sia espresso, anche solo a bassi livelli, nelle cellule del sangue oltre che dalle cellule tumorali, porti all'identificazione di livelli del marcatore sovrastimati per la presenza di trascritti illegittimi. I falsi positivi derivanti da questa situazione sono quindi unicamente legati alle metodiche di isolamento di cellule tumorali da sangue.
2. Utilizzo di un *target* che presenti pseudogeni che portano ad un'espressione illegittima. L'identificazione di falsi positivi con RT-PCR in campioni di sangue, è spesso legato a questo meccanismo. È questo il caso della Ck19, marcatore frequentemente utilizzato per identificare le CTC di carcinoma della mammella, per il quale sono stati recentemente individuati due pseudogeni con elevata omologia di sequenza.
3. Contaminazione con cellule epiteliali o acidi nucleici durante il prelievo ed il processamento del campione.

Tra le tecniche di analisi molecolare sviluppate di recente, c'è l'AdnaTest, un kit commerciale che unisce una separazione immunomagnetica di cellule positive per EpCAM alla successiva RT-PCR per i trascritti dei geni EpCAM, HER2 e MUC1.

In generale, l'RT-PCR risulta una metodica poco costosa e molto sensibile, in grado di rilevare una cellula tumorale in  $10^{6-7}$  cellule non neoplastiche. Tuttavia, la mancanza di un marcatore univoco per ogni neoplasia, ha spinto a ricercare un pannello di trascritti di mRNA tumore o organo specifici. Numerosi studi presenti in letteratura sono stati effettuati con questa tecnica, anche se i risultati appaiono a volte discordanti. [29]

**Tabella 1** Vantaggi e svantaggi dei principali metodi di analisi delle CTC  
[Allan AL, Journal of Oncology 2010]

Method	Estimated sensitivity	Advantages	Disadvantages
PCR-based approaches	$10^{-4}$ – $10^{-6}$	(i) Rapid, quantitative (ii) High sensitivity (iii) Small sample volume required	(i) Does not allow for cell-by-cell analysis (ii) Does not discriminate between viable and nonviable cells (iii) Low specificity (iv) Technical issues with mRNA degradation, etc.
Flow cytometry	$10^{-4}$ – $10^{-5}$	(i) Rapid, quantitative (ii) Cell-by-cell analysis (iii) Multiparameter (iv) High specificity (v) Identification of viable versus nonviable cells (vi) Potential to sort CTCs for additional characterization	(i) Limited sensitivity (ii) Requirement for large sample volume unless sample enrichment used (iii) No visual confirmation of cell specificity (iv) Technically and analytically challenging
Laser scanning cytometry	$10^{-4}$ – $10^{-5}$	(i) Rapid, quantitative (ii) Cell-by-cell analysis (iii) Multiparameter (iv) High specificity (v) Identification of viable versus nonviable cells (vi) Morphological analysis	(i) Limited sensitivity (ii) Technically and analytically challenging
CellSearch (Veridex)	$10^{-7}$	(i) High sensitivity and specificity (ii) Automated, quantitative (iii) Highly reproducible (iv) Moderate sample volume needed (v) Identification of viable versus nonviable cells (vi) Commercially available (vii) Only assay with FDA approval	(i) Limited analysis parameters (ii) Use of EpCam to capture CTCs may miss some tumor cells (iii) Multiple enrichment and processing steps may result in loss of CTCs (iv) Partially subjective readout
CTC microchip	$10^{-7+}$	(i) High sensitivity and specificity (ii) Quantitative (iii) Minimal processing and shear stress (iv) Identification of viable versus nonviable cells (v) Potential to recover CTCs for additional characterization	(i) Technology is not commercially available (ii) Use of EpCam to capture CTCs may miss some tumor cells (iii) Partially subjective readout
EPISPOT	$10^{-7+}$	(i) High sensitivity and specificity (ii) Quantitative (iii) Multiparameter (iv) Only viable tumor cells are detected	(i) Requires 48-hour culture of isolated CTCs before analysis

## MARCATORI MOLECOLARI PER L'ANALISI DELLE CTC

Un marcatore molecolare ideale dovrebbe soddisfare i seguenti requisiti:

- essere espresso specificatamente dalle cellule tumorali (tumore specifico) o essere specifico del tessuto da cui il tumore origina (tessuto specifico);
- non essere presente in nessun tessuto normale o in cellule sane;
- essere di facile analisi e non subire fluttuazioni;
- avere rilevanza dal punto di vista clinico.

Quindi, in realtà, delle tante molecole potenzialmente disponibili come marcatori di CTC, solo poche sono quelle che possono essere concretamente utilizzate per questo scopo. Negli ultimi anni sono state effettuate ricerche mirate all'analisi e alla valutazione di diversi possibili marcatori, mostrando, in alcuni casi, risultati contraddittori.

I marcatori **tessuto-specifici** identificano nelle CTC molecole che sono espresse dal tessuto normale da cui origina la neoplasia, ma non sono espresse normalmente nelle cellule ematiche, nei linfonodi e nel midollo osseo, come ad esempio le citocheratine. I marcatori **tumore-specifici**, invece,

rilevano alterazioni avvenute durante la tumorigenesi, e quindi non presenti nei tessuti normali, sono ad esempio il CEA e le mammaglobine per il carcinoma mammario. [30]

Qui di seguito sono riportati alcuni tra i principali marcatori utilizzati in letteratura per il carcinoma della mammella e dell'ovaio:

- **Mucine, MUC-1 e CA125.** Le mucine sono i maggiori costituenti proteici del muco intestinale che ricopre e protegge la superficie cellulare. Sono state descritte numerose mucine umane che possono essere divise in due categorie: secretorie e legate alla membrana. Esse sono state riconosciute come marker di tessuto epiteliale. I tessuti normalmente esprimono combinazioni di mucine, che sono frequentemente alterate in caso di neoplasia. Per il carcinoma mammario, la mucina più espressa è MUC-1 che è, però, presente anche nelle cellule epiteliali e nei linfociti. Questo comporta una sovrastima del trascritto, portando a risultati falsamente positivi. Per il carcinoma dell'ovaio la mucina più espressa è CA125, ma è presente anche MUC-1. [30]
- **Citocheratine.** Citocheratine (Ck), vimentine e neurofilamenti formano la struttura dei filamenti intermedi citoplasmatici. Questi filamenti si distribuiscono in modo differente nei diversi tipi cellulari. Ad esempio, le vimentine sono espresse nelle cellule muscolari, mesenchimali e gliali, mentre i neurofilamenti sono espressi nei neuroni. Le citocheratine sono, invece, presenti nelle cellule epiteliali e sono una famiglia di oltre 20 proteine. Nell'epitelio umano le più presenti sono la Ck8, Ck18, Ck19 e Ck20, ma per lo studio del carcinoma mammario viene solitamente ricercata la presenza del trascritto della **Ck19**. Tuttavia, essendo espressa a livello basale anche nel tessuto normale, per la sua quantificazione tramite Real-Time PCR, è necessario ottenere un valore soglia a partire da soggetti sani. Questa procedura non è, invece, necessaria anteponendo alla retrotrascrizione un arricchimento immunomagnetico. La Ck19 rappresenta il marcatore più utilizzato per la ricerca di CTC sia da sangue, oltre che da midollo e linfonodi. [18, 21,28,30] Alcuni studi hanno dimostrato una certa espressione di **Ck7** anche nel carcinoma mammario e dell'ovaio (solitamente la Ck7 è un marker di neoplasia polmonare a cellule non piccole), ma anche in questo caso è necessario un arricchimento in cellule cancerose. [18]
- **Mammaglobine.** Le mammaglobine (hMAM) sono glicoproteine associate al carcinoma mammario, nelle cui cellule sono spesso altamente espresse. I geni per la mammaglobina A e B codificano per glicoproteine correlate a una famiglia di proteine epiteliali secretorie, appartengono alle uteroglobine e sono localizzati in 11q12.2. L'espressione di mammaglobine è ristretta a pazienti con carcinoma mammario. Diversi studi hanno

dimostrato che la presenza di alti valori di trascritti di hMAM in sangue e midollo è correlata a carcinomi in stadio avanzato. Il marcatore hMAM è quindi frequentemente utilizzato per la ricerca di CTC da sangue, da midollo e da linfonodi. [18,31,32,33,34]

- **Epidermal growth factor receptor (EGFR).** EGFR viene talvolta utilizzato come marker per l'identificazione di cellule tumorali mammarie tramite RT Real-Time PCR. Benché sembri essere abbastanza specifico per la neoplasia, non mostra una elevata sensibilità diagnostica, e risulta più utile ai fini di una caratterizzazione a scopo terapeutico. [25,30]
- **HER-2.** Recettore di superficie attivo principalmente nel carcinoma della mammella. Conosciuto anche col nome di c-erbB-2/neu. Non si conosce la sua esatta funzione fisiologica ma, negli ultimi anni, è stato scoperto che l'utilizzo di un anticorpo monoclonale (Trastuzumab, Herceptin®) diretto contro questo recettore ha effetti terapeutici. È, quindi, importante poter discriminare la presenza o assenza di questo marker per poter meglio indirizzare la terapia. [7]
- **Maspina.** La maspina, un inibitore serin proteasico mammario, è un oncosoppressore recentemente identificato. Il gene di questa proteina, conosciuta anche come Inibitore Proteasico 5, è localizzato in 18q21.3. La ricerca nel sangue di trascritti per maspina ha dimostrato una buona specificità, ma una sensibilità inferiore a quella di altri marcatori. [18]
- **TERT.** E' la subunità catalitica della telomerasi, enzima responsabile dell'allungamento e del mantenimento dei telomeri. La subunità hTERT, deputata alla regolazione dell'espressione delle due subunità che formano l'enzima telomerasi, sembra coinvolta nello sviluppo di neoplasie, per cui i suoi trascritti sono stati utilizzati come marcatore per la ricerca di CTC in diverse neoplasie [30]

La scelta dei marcatori da utilizzare nel nostro studio per l'analisi in real-time PCR è stata effettuata valutando i risultati dei più recenti lavori in letteratura. La scelta è ricaduta sul marcatore di cellule epiteliali, CK19 in quanto altamente espresso nei carcinomi della mammella, insieme alla Ck7 (espressa anche nel carcinoma dell'ovaio), su hMAM in quanto altamente specifico per il carcinoma della mammella, su MUC-1 e CA125 ed hTERT in quanto riportati in molti lavori di letteratura, ed infine su EGFR e HER-2, marcatori utili sia per l'identificazione di CTC sia come possibili indicatori di terapia.

## **DNA LIBERO PLASMATICO**

La scoperta della presenza di DNA libero, non associato a cellule, nella circolazione sanguigna è stata riportata per la prima volta nel 1948 da Mandel e Matais, che furono in grado di isolare l'acido nucleico dal plasma umano.[35] Questa scoperta, di enorme importanza, non fu, però, inizialmente riconosciuta. Per un lungo periodo di tempo gli studi sul DNA circolante si sono focalizzati soprattutto sulle malattie autoimmuni, come artrite reumatoide e lupus sistemico eritematoso, in cui si ritrovano elevate quantità di DNA circolante.

Le potenziali applicazioni del DNA libero plasmatico (FPDNA, free plasma DNA) nella diagnosi e nella prognosi del cancro sono state per la prima volta dimostrate nel 1977, quando elevati valori di FPDNA furono individuati nel siero di pazienti affetti da neoplasia [35]. Nello stesso studio si annotava come la quantità di FPDNA scendesse in relazione alla risposta alla radioterapia. Alcuni anni dopo, mutazioni di oncogeni, tumore associate, sono state riscontrate nel plasma o nel siero di pazienti affetti da carcinoma pancreatico e leucemia mieloide acuta. Queste scoperte confermano che DNA derivante da cellule tumorali può essere isolato dal siero o dal plasma dei pazienti neoplastici [36].

Successivamente, numerosi studi hanno dimostrato la presenza di FPDNA sia in malati che in individui sani (evidenza che viene associata alle cellule linfocitarie ed alle altre cellule nucleate del sangue), riportando tuttavia una concentrazione mediamente 10 volte superiore nei pazienti affetti da differenti tipi di neoplasia la [37]

## **ORIGINE DEL DNA LIBERO**

Il DNA extracellulare si presenta come una popolazione di molecole alquanto eterogenee, sia per dimensioni sia per composizione. Queste differenze possono derivare dai diversi processi di secrezione e di assorbimento del DNA, così come da una limitata superficie d'accesso dello stesso alla degradazione da parte della nucleasi [38]. Alcuni autori sostengono infatti che la quantità significativamente maggiore di DNA circolante presente nei pazienti neoplastici sia la conseguenza di un malfunzionamento della DNasi. [39].

Ad oggi gli specifici meccanismi di rilascio in circolo del DNA non sono stati pienamente spiegati e sono ancora oggetto di studio, anche se sono state formulate alcune ipotesi, ormai largamente accettate dalla comunità scientifica, circa l'origine endogena della molecola ed il suo incremento nel plasma di pazienti oncologici. Le più accreditate sono quelle di seguito descritte.

### ➤ APOPTOSI

Molti autori sostengono che una quantità significativa di DNA libero presente nei pazienti oncologici derivi dall'apoptosi (morte cellulare "programmata") delle cellule neoplastiche, in quanto analisi elettroforetiche e di microscopia elettronica hanno mostrato, per tale molecola, un diverso pattern di bande, in relazione all'appartenenza a pazienti o ad individui sani. [40].

Strettamente collegate all'ipotesi del rilascio di DNA per apoptosi e a sostegno della stessa, esistono evidenze sulla presenza in circolo dell'acido nucleico associato a proteine istoniche (H2A, H2B, H3, H4 e H1), sottoforma cioè di nucleosoma [41]. Il ruolo dei nucleosomi nella patogenesi delle malattie è solo parzialmente conosciuto, ma si è visto che in patologie autoimmuni come il LES, la presenza di anticorpi anti-nucleosomi precede, in circolo, la comparsa degli anticorpi anti-DNA. Parallelamente nelle patologie tumorali maligne, l'incremento dei nucleosomi circolanti potrebbe essere una strategia tumorale per sfuggire alla sorveglianza immunitaria [38]

Tutte queste considerazioni, associate all'osservazione di un rapido incremento di nucleosomi circolanti durante i cicli di terapia (radio- o chemioterapia), seguito da un altrettanto rapido decremento degli stessi al termine di un trattamento efficace, portano a sostenere che la quantificazione dei suddetti corpi possa rappresentare un efficiente indice della responsività del tumore alla terapia stessa. [41]

### ➤ LISI DI CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI O MICROMETASTASI

Una delle ipotesi per spiegare l'origine del DNA libero circolante è legata alle "micrometastasi" tumorali, riversate nel circolo sanguigno a partire dal tumore primario. La lisi di queste CTC nel circolo sanguigno potrebbe spiegare anche la presenza di frammenti quasi-genomici di FPDNA ritrovati in alcuni pazienti. Tuttavia, diversi studi hanno segnalato che ad una quantità elevata di DNA, isolata da plasma di pazienti affetti da carcinoma, non corrispondeva un altrettanto elevato numero di cellule tumorali in circolo. [42,43]

### ➤ NECROSI

Un'altra ipotesi sostiene che quantità elevate di DNA plasmatico libero in pazienti con tumori avanzati o con metastasi, possano derivare dalla necrosi del tumore stesso, come dimostrato dall'aumento di DNA che si osserva immediatamente (entro 24 ore) dopo cicli di radio-chemioterapia. [43]

In un altro studio, è stato dimostrato che la maggior parte dei frammenti di DNA circolante presentano dimensioni relativamente piccole. [44] Basandosi su questa osservazione, è stato quindi

proposto che i frammenti di DNA mutante possano avere origine da cellule necrotiche che siano state fagocitate dai macrofagi, che ne hanno successivamente rilasciato il DNA frammentato. [45]

#### ➤ RILASCIO ATTIVO E SPONTANEO DI DNA

Il DNA extracellulare può anche essere attivamente rilasciato dalle cellule tumorali viventi. Studi in vitro con colture di cellule linfocitarie o di organi interi hanno mostrato un aumento della concentrazione di DNA presente nel surnatante proporzionale alla proliferazione cellulare: questo rilascio spontaneo, che segue un equilibrio omeostatico, è stato osservato anche in presenza di poche cellule apoptotiche o necrotiche. Ma anche cellule normali, come i linfociti, possono secernere DNA extracellulare attivamente all'inizio e prima della proliferazione cellulare. Inoltre, si ritiene che le cellule rilascino gli acidi nucleici sotto forma di complessi corpi proteici atti al mantenimento dell'acido in questione.[40].

Tuttavia, i dati finora disponibili non sembrano dare spiegazioni convincenti per il meccanismo biologico e per il ruolo della secrezione del DNA.

Nonostante, quindi, l'impossibilità di associare l'origine del DNA extracellulare ad un solo e preciso fenomeno, è indubbio che un aumento della sua quantità in circolo, oltre i livelli di "normalità" (riscontrabili nella popolazione sana), sia correlato ad una situazione patologica.

#### SIGNIFICATO CLINICO DEL FPDNA

Non c'è molta chiarezza nemmeno sui possibili effetti biologici del DNA circolante. È stato proposto che questo DNA alterato e liberamente circolante possa rientrare nelle cellule, agire come un transgene e modificare il patrimonio genetico della cellula. Questa ipotesi ha portato alla creazione del concetto di "genometastasi", che presuppone la trasmissione orizzontale di sequenze di DNA, con potenziale trasformante, in cellule di organi distanti.

Sicuramente una parte del DNA libero nel plasma è di origine tumorale e ciò è dimostrato dalla presenza di alterazioni tumore specifiche che è possibile ritrovarvi, grazie a tecniche di amplificazione, quali la PCR. Le alterazioni riscontrabili comprendono mutazioni dei geni di K-ras, N-ras e p53, ipermetilazione di promotori di oncosoppressori, instabilità microsatellitare (MI) di markers polimorfici e presenza di sequenze di oncogeni virali. Queste alterazioni sono state riscontrate in tipi diversi di neoplasia.[42,44,46]

La determinazione stessa di queste anomalie potrebbe rappresentare un utile strumento diagnostico ed eventualmente anche un fattore prognostico/predittivo. Purtroppo però, le anomalie genetiche

presenti nei carcinomi dei singoli pazienti, sono molto spesso diverse, per cui l'analisi di una determinata alterazione può essere molto specifica ma decisamente poco sensibile. Per ottenere una buona sensibilità diagnostica dovrebbero essere contemporaneamente analizzate più alterazioni, con un notevole aumento di tempi e costi.

Per questo motivo si cerca di attribuire un significato clinico alla quantificazione stessa del DNA libero nel plasma. [47] L'analisi delle quantità di DNA libero sierico in pazienti con tumori maligni e benigni, ha mostrato livelli marcatamente più elevati nei pazienti con neoplasie maligne, e livelli più bassi e variabili, in alcuni casi sovrapponibili ai valori riportati per i controlli sani, nei pazienti con patologie benigne. [46, 48]

Non sempre, però, per la discriminazione tra patologie benigne e maligne, risulta sufficientemente affidabile l'analisi della sola concentrazione del DNA libero, in quanto è stato evidenziato che anche stati d'infiammazione ed infezioni possono causare picchi di FPDNA in pazienti sani o con patologie benigne, portandoli a livelli paragonabili alle neoplasie maligne.

In alcuni studi, la quantificazione del DNA circolante è stata proposta come test per valutare la recidiva neoplastica in pazienti con carcinoma della mammella.[37,49] Mentre studi volti a correlare la presenza o assenza di DNA tumorale circolante e caratteristiche clinico-patologiche di pazienti con carcinoma della mammella hanno mostrato una correlazione tra alti livelli di FPDNA e coinvolgimento linfonodale. [41]

Per quanto riguarda il carcinoma dell'ovaio, l'esistenza di una correlazione tra i livelli di DNA libero circolante di origine tumorale e le dimensioni/diffusione della massa tumorale, è stata recentemente dimostrata in due diversi studi effettuati su modelli ortotopici di carcinoma ovarico.[50,51] Negli stessi studi sono inoltre state descritte variazioni dei livelli di DNA libero plasmatico in seguito al trattamento chemioterapico con agenti citotossici. In particolare, dopo un iniziale, brusco aumento osservabile a 24 ore di distanza dalla somministrazione del farmaco (correlato ad un aumento dell'apoptosi), è stata descritta una rapida diminuzione dei livelli di DNA libero già a partire dal terzo giorno.[50] Un andamento del tutto simile (rapido aumento e successiva diminuzione) è stato osservato anche in relazione a procedure chirurgiche [51].

Al momento, quindi, l'associazione tra la quantità di DNA libero plasmatico e la recidiva di malattia e/o risposta alla terapia sembra essere il punto chiave per l'applicazione di questo test nella routine oncologica.

## MARCATORI SIERICI

Si definiscono biomarcatori sierici circolanti tutte quelle sostanze che, dimostrabili nei fluidi biologici, costituiscono un segnale della presenza e dello sviluppo di una malattia, nel caso specifico dei marcatori tumorali, una neoplasia. La valutazione dei marcatori tumorali, però, non sempre fornisce un'informazione inequivocabile sulla presenza o assenza di una neoplasia, a causa della loro bassa sensibilità e specificità. Le potenzialità diagnostiche non sono tuttavia trascurabili, soprattutto se si considerano le caratteristiche salienti fornite dalla valutazione dei marcatori: dati quantitativi ottenibili in tempi rapidi, in modo agevole, a limitato costo e senza particolari disagi per il paziente.

Il carcinoma mammario è la neoplasia in cui l'applicazione dei marcatori tumorali appare particolarmente controversa. La spiegazione è dovuta soprattutto ai limiti diagnostici di tali markers. Numerosi marcatori sono stati proposti nel corso degli anni per lo studio del carcinoma mammario, ma, attualmente, nella pratica clinica le scelte possono essere limitate al **CEA**, alle citocheratine circolanti (soprattutto **Ck19**) ed alla mucina **MUC1** [24]

**MUC-1** è una mucina legata alla membrana apicale delle normali cellule epiteliali e aberrantemente glicosilata nelle cellule neoplastiche della mammella. A seguito di questa modificazione la proteina viene tagliata ed è individuabile come marcatore sierico denominato **CA15-3**. Il **CA27.29** è invece un anticorpo monoclonale diretto contro MUC-1. La positività a CA27.29 risulta altamente associata al carcinoma della mammella, anche se può essere presente, a livelli abbastanza elevati, anche in altri tipi di neoplasie (carcinoma del colon, gastrico, epatico, polmonare, ovarico) e in alcune patologie benigne. Comunque, va ricordato, che livelli sierici di questa proteina maggiori di 100 U/mL sono in genere estremamente rari nelle patologie benigne. Essendo più specifica e più sensibile, la quantificazione di CA27.29 sta sostituendo quella di CA15.3. Tale marcatore, è infatti, elevato in un terzo delle donne con un carcinoma allo stadio iniziale (I o II) e nei due terzi delle affette da carcinoma in stadi avanzati (III o IV). [52]

L'Antigene Carcinoembrionale (**CEA**) è una glicoproteina appartenente alla famiglia delle immunoglobuline che può essere quantificata nel siero delle pazienti tramite saggi radioimmunologici o tramite ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Il dosaggio del CEA, però, oltre che per la bassa sensibilità, è limitato dalla notevole percentuale di falsi positivi determinando quindi una bassa specificità diagnostica (alti livelli di CEA possono ritrovarsi in caso di altri tipi di neoplasie o di patologie di tipo benigno).

Un ulteriore marcatore sierico è rappresentato dal **CYFRA 21.1**, un frammento della citocheratina 19, utilizzato prevalentemente nella diagnosi e follow-up del tumore del polmone (istotipo squamoso), ma impiegato anche nel carcinoma della mammella.

Riassumendo, il marcatore di riferimento per il carcinoma mammario, è considerato il MUC-1, eventualmente associato al dosaggio di CEA o di CYFRA 21.1.

Come nel caso di altre neoplasie, anche per il carcinoma mammario le concentrazioni dei marcatori sierici e i relativi valori di sensibilità diagnostica sono legati all'estensione della neoplasia. Inoltre, l'analisi di questi marcatori da sola non è sufficiente alla finalità diagnostica, che va sempre supportata da altri approfondimenti clinici, mentre risulta essere più utile nel monitoraggio e follow-up della malattia nei pazienti oncologici.[24]

Per il carcinoma ovarico, invece, il marcatore sierico d'elezione è il CA125. [53]

Il CA125 è una glicoproteina prodotta dal tessuto epiteliale ovarico, che viene riconosciuta nel siero delle pazienti utilizzando un anticorpo monoclonale specifico. Il normale livello di CA125 nel sangue è inferiore a 35 IU/mL e la sua sensibilità si attesta intorno all'80%. Anche per questo marcatore, il suo aumento non è sufficiente, da solo, a formulare una diagnosi certa di malignità. Esistono infatti numerose condizioni, sia fisiologiche che patologiche, in cui si registra un aumento del CA125; tra queste: il primo trimestre della gravidanza, il ciclo mestruale, lesioni non cancerose (es. endometriosi), ed altre neoplasie, tra cui quelle a carico della mammella, del fegato e del colon-retto. Inoltre lo stesso carcinoma ovarico può non produrre quantità sufficienti di CA125 e dare quindi falsi negativi depistando la diagnosi.

Tuttavia, nonostante i sopraccitati limiti, l'impiego di tale marcatore in combinazione con metodiche di imaging rappresenta la routine clinica per la diagnosi e il monitoraggio della neoplasie ovariche.

## SCOPO DELLA TESI

La crescente necessità, nell'ambito dell'oncologia clinica, di poter disporre di marcatori efficaci e scarsamente invasivi per il monitoraggio e la stratificazione del rischio dei pazienti neoplastici, ha portato molti gruppi di ricerca ad indagare il ruolo di nuovi marcatori molecolari, tra cui le cellule tumorali circolanti (CTC) e gli acidi nucleici circolanti. Le promettenti evidenze portate dalla recente letteratura relativamente ad alcune neoplasie, quali il carcinoma metastatico della mammella e della prostata, supportano la necessità di implementare le conoscenze su questi marcatori e di indagarne il ruolo in soggetti affetti da neoplasie solide in vario stadio. E' in questo contesto che si colloca il nostro studio, il cui scopo è quello di valutare le potenzialità della quantificazione del DNA libero plasmatico e dell'individuazione di cellule tumorali circolanti nel sangue periferico di pazienti con neoplasie solide di diverso tipo (mammella e ovaio).

In particolare, la valutazione di questi due promettenti marcatori molecolari è stata effettuata in tre diversi gruppi di pazienti (con carcinoma della mammella metastatico; con carcinoma della mammella in stadio precoce o localmente avanzato; con carcinoma dell'ovaio in stadio avanzato), in momenti successivi del loro iter diagnostico-terapeutico, al fine di valutare:

1. l'impatto di CTC e FPDNA al momento del prelievo basale a scopo diagnostico e /o prognostico;
2. l'andamento dei marcatori CTC e FPDNA durante la chemioterapia neoadiuvante o adiuvante per verificare se possano aver un ruolo nel predire la risposta al trattamento e la prognosi;
3. l'utilità di tali marcatori rispetto agli attuali marcatori sierici in uso nella clinica.

Le analisi oggetto di questo studio sono state effettuate mediante metodiche di Real Time PCR ottimizzate nel nostro laboratorio. Inoltre, per l'individuazione delle CTC, effettuata attraverso la valutazione di trascritti di marcatori tumore e tessuto specifici, sono state testate due diverse procedure per il recupero delle CTC dal sangue periferico: questo ha permesso di effettuare anche un'analisi comparativa per valutare la sensibilità delle due metodiche.



# MATERIALI E METODI

## SELEZIONE DELLE PAZIENTI

Lo studio è stato condotto in tre diverse coorti di pazienti, tutte afferenti al reparto di Oncologia Medica del Policlinico S.Orsola Malpighi:

- 1) 20 pazienti con carcinoma della mammella metastatico;
- 2) 40 pazienti con carcinoma della mammella localizzato o localmente avanzato
- 3) 50 pazienti con carcinoma dell'ovaio in stadio avanzato

In particolare, relativamente ai gruppi 2 e 3, le valutazioni oggetto di studio sono state effettuate nell'ambito dei progetti denominati rispettivamente ARIANNA 01 e ARIANNA 02. Tali progetti, promossi dallo stesso Policlinico, e approvati dal Comitato Etico Ospedaliero, hanno visto la collaborazione di diverse UU.OO: (Oncologia Medica, Anatomia e Istologia Patologica, Medicina Nucleare e Chirurgia Generale) per la valutazione prospettica dell'impiego di marcatori biologici e analisi strumentali in corso di chemioterapia neoadiuvante.

### **1 PAZIENTI CON CARCINOMA DELLA MAMMELLA METASTATICO**

Le 20 pazienti arruolate in questo gruppo sono state selezionate in base alla presenza di metastasi in organi a distanza (stadio IV). In particolare, al momento dell'arruolamento 13/20 (65%) pazienti avevano metastasi in almeno 3 organi. L'età media delle pazienti era di 61.6 anni, con età compresa tra i 44 e i 79 anni.

Le pazienti sono state sottoposte a diverse linee di terapia adiuvante (vedi Tab. 2) somministrate come cicli mensili. In corrispondenza del terzo-quarto ciclo, per ogni paziente è stata valutata la risposta clinica alla terapia tramite TAC e/o PET, così definita:

**RT1.** risposta completa ai farmaci e regressione della neoplasia

**RT2.** risposta parziale ai farmaci.

**RT3.** situazione stazionaria, senza miglioramenti clinici né ricadute.

**RT4.** assenza di risposta e progressione tumorale

**RT5.** risposta non valutabile (paziente deceduta o volontariamente uscita dal protocollo prima della valutazione)

**Tabella 2:** Caratteristiche delle pazienti con carcinoma della mammella metastatico

pts	Età	Linea	Terapia	Sede di metastasi
M1	52	3	Xeloda	Polmone, versamento pleurico
M2	71	1	FEC	Cute, ossa, fegato
M3	69	2	FEC	Linfonodi, fegato, polmone
M4	78	3	VNR	Linfonodi, versamento pleurico, versamento pericardio neoplastico
M5	74	1	VNR e Femara	Cute, ossa, versamento pleurico
M6	52	1	Adriamicina e Taxolo	Linfonodi, cute, ossa, fegato
M7	44	2	FEC	Ossa, fegato
M8	50	1	Adriamicina e Taxolo	Cute, ossa, fegato, polmone
M9	51	4	Xeloda	Linfonodi, ossa, polmone
M10	79	3	MAP	Ossa, fegato
M11	56	1	Taxotere	Linfonodi, ossa, fegato, versamento pleurico
M12	70	2	FEC	Linfonodi, cute
M13	61	3	Caelyx e Taxotere	Linfonodi, cute, ossa
M14	52	3	Taxotere	Linfonodi, ossa
M15	63	3	5-FU e VNR	Linfonodi, ossa, fegato, polmone, versamento pleurico
M16	59	5	5-FU e VNR	Linfonodi, cute, ossa
M17	63	5	Taxotere	Ossa, encefalo
M18	69	2	Caelyx e Taxotere	Linfonodi, polmone, utero
M19	53	2	Xeloda	Ossa
M20	66	3	Caelyx	Ossa, versamento pleurico

## **2 PAZIENTI CON CARCINOMA DELLA MAMMELLA LOCALIZZATO O LOCALMENTE AVANZATO (STUDIO ARIANNA 01)**

Pazienti con una diagnosi di carcinoma della mammella in stadio precoce o localmente avanzato sono state arruolate nel progetto Arianna 01 e sono divenute oggetto di questo studio. Delle 40 pazienti arruolate, al momento della diagnosi 9 (22.5%) erano in stadio IIA, 9 (22.5%) in stadio IIB, 11 (27.5%) in stadio IIIA, 5 (12.5%) in stadio IIIB e 6 (15%) in stadio IV (oligometastatiche). L'età media delle pazienti era 48.8 anni, con range da 31 a 72 anni.

Secondo quanto previsto dal progetto Arianna, al momento dell'arruolamento tutte le pazienti sono state sottoposte ad una serie di analisi strumentali (mammografia, risonanza magnetica, FDG-PET/CT) e ad una biopsia tissutale per l'analisi istologica. Successivamente 10 pazienti sono state sottoposte a 6 cicli di chemioterapia neoadiuvante a base di antracicline e taxani mentre le restanti 30 pazienti a 8 cicli di antracicline e taxani in regime sequenziale (4+4). Durante il trattamento

neoadiuvante, le pazienti sono state monitorate attraverso la valutazione di marcatori sierici (CEA e CA15.3) e con analisi strumentali a scadenze prefissate, mentre al termine della terapia sono state sottoposte ad intervento chirurgico. Sui campioni operatori post-trattamento è stata valutata la risposta patologica alla terapia, utilizzando la classificazione di Miller-Payne. [54]

### ***Caratterizzazione biopatologica***

Per ciascuna paziente che ha completato lo studio sono stati raccolti i campioni di tessuto neoplastico pre (biopsia) e post (pezzo operatorio) trattamento. Dai suddetti campioni di tessuto paraffinato sono state ottenute, ove possibile, sezioni seriate da 3 µm per la valutazione dell'espressione dei seguenti marcatori molecolari: ER (Estrogen Receptor), PgR (Progesteron Receptor), HER2, EGFR e l'indice di proliferazione cellulare Ki-67. L'analisi dei marcatori è stata effettuata mediante reazione immunohistochimica (IHC) sul sistema automatizzato BenchMark XT (Ventana, Roche) utilizzando il sistema di rivelazione UltraView DAB ed i seguenti anticorpi prediluiti (anti-ER, clone SP-1; anti-PgR, clone 1E2; anti-Ki67, clone 30-9; anti-HER2, clone 4B5 (Ventana) e anti-EGFR, clone DAK-H1-WT (DakoCytomation)). L'espressione dei marcatori ER, PgR e Ki67 è stata valutata in modo quantitativo utilizzando un analizzatore d'immagine, mentre per i marcatori HER2 ed EGFR è stata effettuata una valutazione semiquantitativa (score da 0 a 3). Inoltre, per meglio definire lo status di HER2 a fini prognostici/terapeutici, i campioni risultati 2+ e 3+ all'analisi IHC, sono stati sottoposti anche a valutazione dello stato di amplificazione del gene HER2 mediante reazione di ibridazione in situ fluorescente (FISH) utilizzando il kit PathVysion HER2 DNA Probe kit (Vysis, AbbottMolecular).

In base ai risultati ottenuti i campioni sono stati classificati nelle quattro classi molecolari: Luminal A, Luminal B, HER2 e Basal Like/Triple Negative.

### **3 PAZIENTI CON CARCINOMA OVARICO AVANZATO (ARIANNA 02)**

Il gruppo di pazienti con carcinoma ovarico oggetto di questo studio, è rappresentato da 50 pazienti (età media 64.5 anni, range 43-79 anni) con diagnosi di carcinoma ovarico in stadio avanzato, arruolate nello studio prospettico non randomizzato denominato Progetto Arianna 02.

Delle 50 pazienti arruolate, al momento della diagnosi 1 (2%) era in stadio IIIB, 26 (52%) erano in stadio IIIC e 23 (46%) in stadio IV, secondo la classificazione FIGO. Essendo questi stadi avanzati non passibili di chirurgia ottimale, le pazienti sono state sottoposte a 6 cicli di chemioterapia neoadiuvante a base di carboplatino (AUC 4 o 5) e paclitaxel (135-175 mg/mq). Al termine della terapia, le pazienti che hanno mostrato una risposta clinica completa o parziale (valutata con TAC, PET, MRI e dosaggio di CA125), sono state sottoposte all'intervento chirurgico (isterectomia,

salpingo- oforectomia bilaterale, omentectomia e analisi dei linfonodi pelvici) e poi successivamente seguite con periodici esami di follow-up.

### **RACCOLTA DEI CAMPIONI**

Per ogni partecipante allo studio sono stati raccolti campioni di sangue periferico ad intervalli di tempo prefissato. In dettaglio: per le pazienti con carcinoma della mammella metastatico, al momento dell'arruolamento e immediatamente prima di ogni ciclo di terapia; per le pazienti coinvolte nei progetti Arianna 01 e 02, secondo lo schema riportato in Tab.3., ovvero: prima dell'inizio della terapia (prelievo basale); prima di ciascuno dei successivi cicli di chemioterapia; prima dell'intervento chirurgico (dopo 6-8 cicli di terapia); a 24 ore, 10 giorni ed 1 mese dopo l'intervento.

Da ciascuna paziente sono stati prelevati 24 mL di sangue aliquotati in quattro distinte provette contenenti anticoagulante EDTA (Sistema Vacuette), numerate in senso crescente (da 1 a 4) a partire dalla *venipuncture*. In tutti i casi la prima provetta è stata utilizzata per l'analisi del DNA libero plasmatico, mentre le successive per l'identificazione di CTC. <sup>a</sup>

Le provette di sangue sono state processate entro 2 ore dal prelievo.

**Tabella3:** Schema delle analisi previste per le pazienti arruolate nel progetto Arianna 01 e 02.

ARIANNA 01 Ca Mammella – Stadio II-III	Basale	Prima di ogni ciclo	Ogni 2 cicli	Prima intervento	24 h dopo intervento	10-14 gg dopo intervento	1 mese dopo intervento
Mammografia	X		X	X			
Ecografia mammella e cavo ascellare	X		X	X			
RM mammella e cavo ascellare	X		X	X			
PET segmentaria mammella e cavo ascellare	X		X	X			
PET total body	X						
TC torace-addome	X						
Scintigrafia ossea	X						
Core biopsy (3 frustoli)*	X						
Biopsia linfonodo sentinella	X						
CEA e CA 15.3	X	(X)		X	X	X	X
Prelievi ematici per CTC e FPDNA	X	X		X	X	X	X
Prelievi ematici per EGF, VEGF, UPA, PAI-1, sHER-2	X	X		X	X	X	X

<sup>a</sup> La provetta 1 non è stata utilizzata per l'analisi delle CTC in quanto il sangue in essa contenuto poteva essere inquinato con residui di cellule epiteliali derivanti dall'iniezione dell'ago al momento del prelievo, e quindi essere causa di risultati falsi positivi.

## **QUANTIFICAZIONE DEL DNA LIBERO PLASMATICO (FPDNA)**

La provetta n°1 di ciascun paziente, contenente 6 mL di sangue intero, è stata utilizzata per la raccolta del plasma, ottenuto mediante 2 centrifugazioni successive (2500 g x 10 minuti, a 4°C). Il plasma recuperato è stato quindi suddiviso in aliquote da 1 mL e conservato alla temperatura di -80°C fino alla successiva estrazione degli acidi nucleici circolanti.

L'estrazione del DNA circolante è stata effettuata manualmente utilizzando un kit commerciale (QIAamp Blood Mini kit, Qiagen, Valencia, CA, USA), seguendo il protocollo della ditta produttrice. Per ciascuna paziente sono state analizzate due aliquote da 1 mL di plasma.

La valutazione della concentrazione del DNA ottenuto è stata effettuata mediante la tecnica di Real Time PCR utilizzando il kit Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Tale kit, disegnato per quantificare l'ammontare totale di DNA umano amplificabile in un determinato campione, combina in realtà due saggi:

- 1) l'amplificazione del gene costitutivo hTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase gene), localizzato sul cromosoma 5 (5p15.33).
- 2) un saggio di controllo interno (IPC, internal PCR control) che, misurando l'amplificazione di uno stampo sintetico non presente in natura, rappresenta un indicatore della qualità del DNA estratto.

La reazione di Real Time PCR è stata effettuata con lo strumento ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem), utilizzando il seguente profilo termico: denaturazione a 50°C per 2 minuti, attivazione della polimerasi a 95° C per 10 minuti, 50 cicli di amplificazione, con denaturazione a 95°C per 15 secondi e successivo appaiamento dei primers ed estensione a 60° per 1 minuto. Per ciascun campione la reazione di PCR è stata effettuata in un volume totale di 25 µL utilizzando 2 µL di DNA estratto; ogni campione è stato analizzato in duplicato, unitamente con opportuni controlli positivi (campioni di riferimento per controllare la riproducibilità inter piastra) e negativi.

I dati sono stati analizzati usando il software Sequence Detection System (Applied Biosystem) e la determinazione della concentrazione di DNA è stata ottenuta per interpolazione dei risultati (ciclo soglia di amplificazione,  $C_T$ , di ciascun campione) con la curva standard di calibrazione, costruita

secondo le indicazioni della ditta produttrice del kit. <sup>b</sup> La quantità di DNA libero plasmatico di ciascun campione è stata espressa come ng DNA /mL plasma.

## **ISOLAMENTO DELLE CTC**

Il sangue prelevato nelle provette 2, 3 e 4, è stato utilizzato per l'isolamento delle Cellule Tumorali Circolanti, che si ritiene sedimentino insieme alle cellule Mononucleate del sangue (Buffy coat) dopo centrifugazione su gradiente di densità.

La metodica impiegata prevede la diluizione 1:1 di 4mL di sangue intero con 4mL di Tampone PBS 1X a pH 7.6 (Phosphate Buffered Salin), l'incubazione su ruota mixer a temperatura ambiente per 10 minuti e la successiva centrifugazione a 400g per 30 minuti a temperatura ambiente su gradiente di densità (terreno isoosmotico Ficoll-Paque PLUS, Amersham Pharmacia Biotech UK). Una volta raccolto l'anello (Buffy coat) contenente le cellule Mononucleate e le eventuali CTC, la sospensione cellulare è stata diluita 1:1 con PBS 1X e centrifugata a 400g per 15 minuti a temperatura ambiente.

Il pellet di cellule ottenuto dalle provette 2 e 3 è stato utilizzato per l'estrazione dell'RNA totale mentre il pellet della provetta 4 è stato sottoposto alla procedura di arricchimento immunomagnetico.

## **ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE DA BUFFY COAT**

Il pellet di cellule ottenuto dalle provette 2 e 3 di ciascuna paziente è stato risospeso in 1 mL di TRIzol (Invitrogen, Oslo, Norway) e impiegato per l'estrazione dell'RNA totale, seguendo il protocollo della ditta produttrice. Brevemente, previa aggiunta di cloroformio (200µl) e successiva centrifugazione a 4°C (12.000g per 15 minuti), da ciascun campione è stata recuperata la fase acquosa. Per ottenere la precipitazione dell'RNA, a ciascun campione sono stati aggiunti alcol isopropilico (500µl) e glicogeno (1µl); i campioni sono stati quindi incubati a temperatura ambiente per 10 minuti e nuovamente centrifugati (12.000g per 15 minuti). Il pellet recuperato è stato poi lavato per due volte con alcol 70° ed infine risospeso in acqua distillata (25µl).

La quantità e la qualità dell'RNA estratto sono state valutate mediante la lettura dell'assorbanza ( $\lambda=260\text{nm}$  e  $280\text{ nm}$ ) allo spettrofotometro (BECKMAN DU530 Series).

---

<sup>b</sup> Per costruire la curva di calibrazione sono stati analizzati standard a concentrazione nota ottenuti mediante diluizioni seriali dello stock TaqMan Control Human Genomic DNA, fornito dal kit (range da 50 ng/µL a 0.023 ng/µL). L'equazione della curva standard ottenuta è stata la seguente:  $y=-3.024 x + 28.728$ , dove  $x=\log C_0$  e  $y=C_t$ . I valori di  $C_T$  di ciascun campione sono stati ricavati fissando il Threshold a 0.2, come stabilito dal kit, quindi interpolati con la curva standard per ricavare la concentrazione di DNA.

### ARRICCHIMENTO IMMUNOMAGNETICO DI CTC DA BUFFY COAT

Per isolare una maggiore quantità di RNA proveniente specificatamente dalle CTC, il pellet ottenuto dalla provetta numero 4 di ogni paziente è stato sottoposto ad un arricchimento immunomagnetico di cellule epiteliali, utilizzando il kit Dynal Epithelial Enrich (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway). Tale kit è costituito da biglie paramagnetiche di polistirene ( $\varnothing$  4,5  $\mu$ m) coniugate all'anticorpo monoclonale anti BerEp4: questo anticorpo è in grado di riconoscere in modo specifico l'antigene EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecole), una molecola espressa sulla superficie della maggior parte delle cellule di derivazione epiteliale, incluse quelle del carcinoma della mammella e dell'ovaio.

La metodica di arricchimento è stata effettuata come segue, secondo le indicazioni della casa produttrice:

Preparazione dei Dynabeds Ber-EP4: un adeguato volume di Dynabeds Ber-EP4 (25 $\mu$ L per ogni campione di cellule da processare) è stato prelevato dal kit e trasferito in una eppendorf autoclavata. La provetta è stata quindi posizionata all'interno del magnete Dynal MPC-S (Magnetic Particle Concentrator) per 2 minuti, in modo da far aderire le biglie alla parete e poter eliminare il tampone di conservazione. Successivamente, sempre sfruttando la forza magnetica d'attrazione, ossia avvicinando e allontanando la provetta al magnete, i Dynabeds sono stati lavati per due volte con 1 mL di Washing Buffer (WB) freddo (composto da PBS 1%, BSA 0,1%, Na Citrato 0,6%), risospesi in un volume di WB uguale a quello prelevato inizialmente ed infine dispensati in nuove eppendorf in aliquote di 25 $\mu$ l.

Isolamento di cellule epiteliali dalle MNCs: Il pellet di cellule MNC ottenuto dalla provetta numero 4 è stato risospeso in 1 mL di WB-MNC (composto da PBS 1%, FCS 1%, NaCitrato 0,6%), addizionato ai 25  $\mu$ l di Dynabeds anti Ber-EP4 precedentemente lavati e quindi sistemato sulla ruota mixer a 4 °C per 30 minuti. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati posizionati sul magnete per 2 minuti a 4°C ed il surnatante è stato eliminato. Il complesso "biglie-cellule esprimenti l'antigene Ber-EP4" è stato lavato per 4 volte con 800 $\mu$ l di WB-MNC freddo ed infine risospeso in 100 $\mu$ l di Lysis/Bindig Buffer, un tampone in grado di rompere il legame tra le rosette di cellule e le biglie magnetiche. Al termine di una incubazione di 5 minuti nel magnete è stato recuperato il surnatante contenente le CTC, impiegato per le successive analisi molecolari.

### ESTRAZIONE MAGNETICA DI mRNA

Il pellet arricchito in CTC è stato utilizzato per l'estrazione del mRNA, mediante un kit fornito dalla stessa ditta, Dynabeads mRNA DIRECT Microkit, (DynalAS, Oslo, Norway). Tale kit è costituito

da sequenze di Oligo dT coniugate con biglie paramagnetiche di polistirene in grado di complementare le sequenze di poly (A)<sup>+</sup> presenti nel mRNA.

La metodica è stata eseguita seguendo le istruzioni della casa produttrice, come riportato di seguito:

Lavaggio dei Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub>: un volume pari a 20 µL di Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub> per ciascun campione è stato trasferito in una provetta sterile e posizionato nell'apposito magnete per 30 secondi, in modo da poter eliminare il surnatante. I Dynabeads Oligo(dT)<sub>25</sub> sono quindi stati lavati per due volte con il tampone Lysis/Binding buffer (fornito dal kit), risospesi nel medesimo tampone e dispensati in nuove eppendorf in aliquote di 20µL.

Estrazione dell'mRNA: i 20µl di Dynabeads Oligo(dT)<sub>25</sub> precedentemente lavati sono stati aggiunti ai 100 µL di lisato ottenuti al termine della procedura di arricchimento immunomagnetico anti-Ber-EP4. Le provette contenenti i due prodotti sono state sistemate nella ruota Dynal mixer per 5 minuti a temperatura ambiente, in modo tale da permettere ai primers Oligo(dT)<sub>25</sub> di appaiarsi con le sequenze poly (A)<sup>+</sup> degli mRNA. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati sistemati nel magnete per 30 secondi ed è stato eliminato il surnatante. I complessi Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub>/mRNA così isolati, sono stati lavati per tre volte, prima con 100µl di Washing Buffer A (fornito dal kit) poi con 100µl Buffer B (fornito dal kit) ed infine con 100µl di Tris-HCl 10mM freddo. Una volta eliminato il surnatante, ciascun campione è stato addizionato di 13µl di Tris-HCl 10mM freddo (4°C), incubato a 85°C per 2 minuti in Thermal block (Tehtnica, Vortemp 56EVC) ed infine posizionato nel magnete. Il surnatante, contenente l'mRNA estratto, è stato prelevato, trasferito in una nuova eppendorf sterile DNasi- RNasi free e conservato alla temperatura di -80°C per le successive analisi.

### SINTESI DI cDNA (RT-PCR)

Per la sintesi del DNA complementare a singolo filamento (cDNA) a partire dall'RNA estratto (totale o mRNA) è stato utilizzato il kit High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystem). La reazione di retrotrascrizione è stata effettuata sul termociclatore Thermal Cycler (MJC, PTC-100 Medical-Research, Watertown, MA, USA), utilizzando le seguenti condizioni termiche: 25°C per 10 minuti, 37°C x 2 ore e 95°C x 5 minuti.

La reazione è stata effettuata a partire da:

- 1µg di RNA totale (ottenuto dalle provette 2 e 3 di ciascuna paziente, estratte con Trizol) in un volume totale di 25µL;

- 13 µL di mRNA (ottenuto dalla provetta 4, estratto con arricchimento immunomagnetico) in un volume totale di 30 µL. (Quest'ultima variazione di volume si è resa necessaria per poter analizzare un maggior numero di marcatori di marcatori nella successiva reazione di Real-Time PCR)

### REAL TIME PCR

Per valutare l'espressione dei marcatori Ck19, hMAM, Ck7, Her-2, EGFR, MUC-1, CA125 e hTERT è stata utilizzata una metodica di real-time PCR utilizzando i primer e probe riportati nella tabella 4, sintetizzati da Applied Biosystem (Custom Primers o Gene Expression Assays).

Come gene costitutivo di riferimento è stato utilizzato GUSB (Glucoronidasi Beta, TaqMan Endogenous Controls (Applied Biosystem)).

**Tabella 4:** Primers e probes utilizzati in Real Time PCR

gene	
<b>Ck19</b>	<b>PRIMER FORWARD:</b> 5'-TCG ACA ACG CCC GTC TG-3' (esone 2)
	<b>PRIMER REVERSE:</b> 5'-CCA CGC TCA TGC GCA G-3' (esone 3)
	<b>PROBE:</b> 5'-6-FAM-CCG AAC GTT GTA GAC GGA ACA GG-MGB-3'
<b>hMAM</b>	<b>PRIMER FORWARD:</b> 5'-ATG AAG TTG CTG ATG GTC CTC AT-3' (esone 1)
	<b>PRIMER REVERSE:</b> 5'-GTC TTA GAC ACT TGT GGA TTG ATT GTC T-3' (esone 2)
	<b>PROBE:</b> 5'-6-FAM-CGG CCC TCT CCC AGC ACT GC-MGB-3'
<b>Ck7</b>	<b>PRIMER FORWARD:</b> 5'-TGA ATG ATG AGA TCA ACT TCC TCA G-5' (esone 4)
	<b>PRIMER REVERSE:</b> 5'-TGT CGG AGA TCT GGG ACT GC-3' (esone 5)
	<b>PROBE:</b> 5'-6-FAM-ACC CTC AAT GAG ACG GAG TTG ACA GAG CTG-MGB-3'
<b>MUC-1</b>	<b>PRIMER FORWARD:</b> 5'-GTG CCC CCT AGC AGT ACC G-3' (esone 6)
	<b>PRIMER REVERSE:</b> 5'-GAC GTG CCC CTA CAA GTT GG-3' (esone 7)
	<b>PROBE:</b> 5'-6-FAM-AGC CCC TAT GAG AAG GTT TCT GCA GGT AAT G-MGB-3'
<b>Her-2</b>	Hs 00170433-m1 (esoni 15-16)
<b>EGFR</b>	Hs 00193306-m1 (esoni 20-21)
<b>hTERT</b>	Hs 00162669_m1 (esoni 11-12)
<b>CA125</b>	Hs 00226715_m1 (esoni 83-84)

La reazione di amplificazione è stata condotta in un volume totale di 25 µL, ottenuto combinando: 12.5 µl di TaqMan Master Mix (Applied Biosystem), 2 µl di cDNA e un volume variabile di primers/probe dei singoli marcatori e di acqua RNase DNase free (GIBCO, INVITROGEN). I volumi utilizzati sono riportati nella tabella 5.

	probe/ primers mix	Primer Forward	Primer Reverse	Probe	acqua
<b>Her-2, EGFR, hTERT, CA125 e GUSB</b>	1.25 µl				9.25 µl
<b>Ck19</b>		0.25 µl	0.25 µl	0.05 µl	9.95
<b>MUC-1 e Ck7</b>		0.1 µl	0.1 µl	0.05	10.25
<b>hMAM</b>		0.11 µl	0.11 µl	0.05	10.23

**Tabella 5:** Volumi di Primers, probe e acqua utilizzati per la reazione di PCR

Il profilo termico della reazione è stato il seguente: 2 minuti a 50°C, 10 minuti a 95°C, 50 cicli di amplificazione con 15 secondi a 95°C e 1 minuto a 60°C. L'amplificazione è stata effettuata sullo strumento ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem) utilizzando piastre da 96 pozzetti. Ogni campione è stato analizzato in duplicato ed in ogni seduta sono stati inseriti controlli negativi (acqua e controllo negativo della reazione di retrotrascrizione) e controlli positivi (campioni calibratori/campioni di riferimento per garantire la riproducibilità inter piastra).

I dati sono stati analizzati usando il software Sequence Detection System (Applied Biosystem). Il valore del  $C_T$  (ciclo soglia) di ciascun campione è stato calcolando fissando il *threshold* a metà della fase di incremento esponenziale della fluorescenza, cioè dove le curve di amplificazione risultano parallele fra loro.

## QUANTIFICAZIONE DEI RISULTATI

La quantificazione dei risultati è stata diversa, relativa o assoluta, a seconda del materiale di partenza.

### Quantificazione relativa per l'analisi dei marcatori da Buffy Coat

Per l'analisi dell'espressione dei marcatori **Ck19** ed **hMAM** (per il carcinoma della mammella) e del marcatore **CK7** (per il carcinoma dell'ovaio) da RNA totale ottenuto a partire da buffy coat è stata utilizzata una metodica di quantificazione relativa, con il metodo del  $\Delta\Delta C_T$ . Come calibratore è stato utilizzato un campione di sangue proveniente da un controllo sano, addizionato di 100 cellule MDA-MB 453 (per valutare la Ck19), di 100.000 cellule MDA-MB 453 (per valutare hMAM) e di 100 cellule NIH-OVCAR3 (per valutare la CK7).

In breve, il metodo del  $\Delta\Delta C_T$  prevede innanzitutto che i valori di  $C_T$  siano normalizzati ai valori ottenuti per il gene costitutivo GUSB, allo scopo di eludere eventuali differenze nella sintesi del cDNA e per verificare la qualità dell'RNA estratto.

$$\Delta C_T = C_T (\text{Ck19 o hMAM o CK7}) - C_T (\text{GUSB})$$

Poi, per calcolare la concentrazione relativa del marcatore in esame, occorre calcolare la differenza tra il  $\Delta C_T$  del marcatore e quello del calibratore, inserito nella medesima seduta di corsa.

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T \text{Pz} - \Delta C_T \text{Cal}$$

Infine, la concentrazione relativa si ottiene con la formula  $= 2^{-\Delta \Delta C_T}$ , e viene espressa come AU (*arbitrary units*).

### Quantificazione assoluta per l'analisi di tutti i marcatori dopo arricchimento immunomagnetico

Per la quantificazione dell'ampio pannello di marcatori effettuato su mRNA ottenuto dopo arricchimento magnetico, è stata invece adottata una metodica di quantificazione assoluta, che prevede l'utilizzo di una curva standard diversa per ogni marcatore. Interpolando alla curva standard il valore medio di  $C_T$  di ciascun campione si ottiene il valore della concentrazione per quel marcatore, espressa come CTC/ml di sangue o ng di cDNA/ ml di sangue.

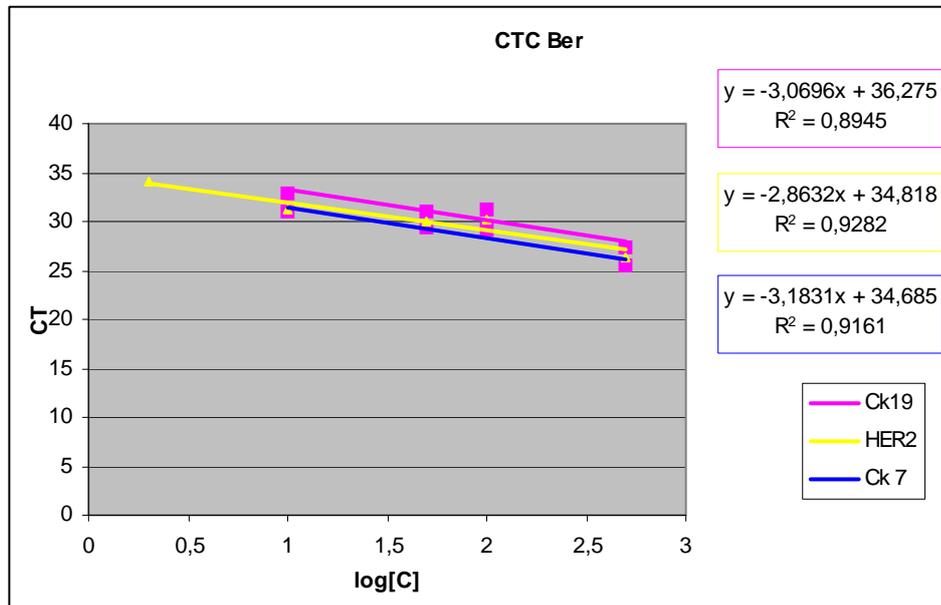
### COSTRUZIONE DELLE CURVE STANDARD X L'ANALISI DEI MARCATORI DEL CARCINOMA DELLA MAMMELLA

Per costruire la curva standard per la determinazione dei livelli di espressione di RNA dei marcatori **Ck19**, **Ck7** ed **Her-2** sono stati utilizzati campioni di sangue intero di pazienti sani, forniti dal Centro Trasfusionale dell'Azienda Ospedaliera S.Orsola-Malpighi, addizionati con concentrazioni crescenti di cellule tumorali di carcinoma mammario della linea MDA-MB 453.

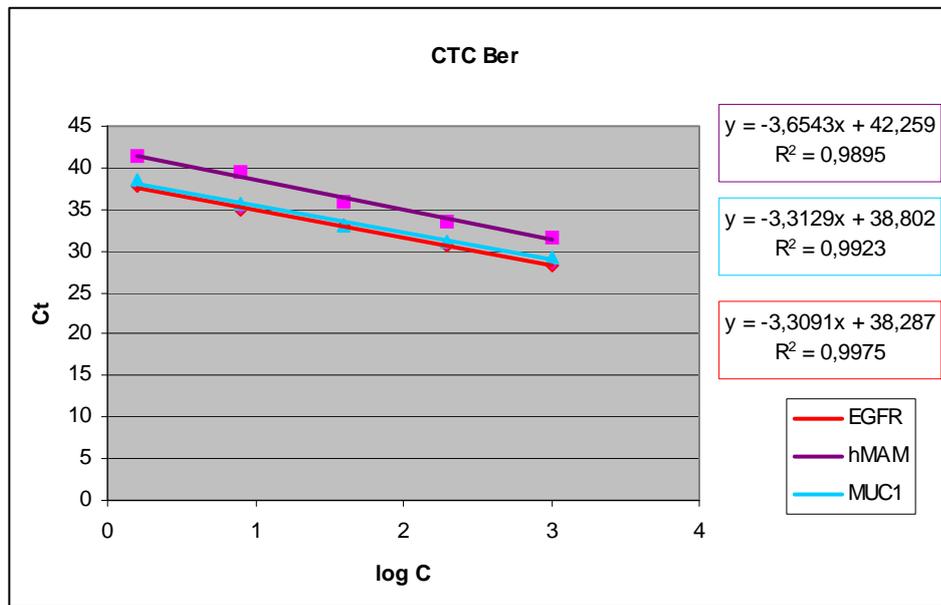
Più precisamente la curva standard è stata ottenuta addizionando a 4ml di sangue intero di donatore sano 10, 50, 100 e 500 cellule MDA-MB 453/ml. Da ciascun campione a concentrazione nota, una volta raccolto il Buffy Coat, si è proceduto al recupero delle cellule tumorali con la metodica di arricchimento immunomagnetico, all'estrazione dell'mRNA, alla retrotrascrizione e, per finire, alla quantificazione in PCR Real-Time. A partire dai valori di  $C_T$  sono state costruite le singole curve standard, mostrate in figura 3.

Per i marcatori **EGFR**, **hMAM** e **MUC-1**, dopo aver verificato che le cellule MDA-MB 453 esprimono tali markers in concentrazioni non elevate, la costruzione delle curve standard è stata ottenuta a partire da diluizioni scalari di RNA dello stock di cellule MDA-MB 453 (diluizioni scalari 1:5, partendo da un stock di 2 milioni di cellule/ml), che è stato retrotrascritto a cDNA e poi amplificato in PCR Real-Time. Più precisamente, le curve di calibrazione sono state ottenute dall'analisi di campioni standard alle seguenti concentrazioni: 1000 ng, 200 ng, 40 ng, 8 ng e 1.6

ng di RNA dallo Stock di MDA-MB 453. Le curve standard costruite usando i valori di  $C_T$  ottenuti per ciascun campione sono riportate in figura 4.



**Figura 3:** Curve standard di amplificazione dei marcatori CK19, CK7 ed HER2 per il carcinoma della mammella e relative equazioni



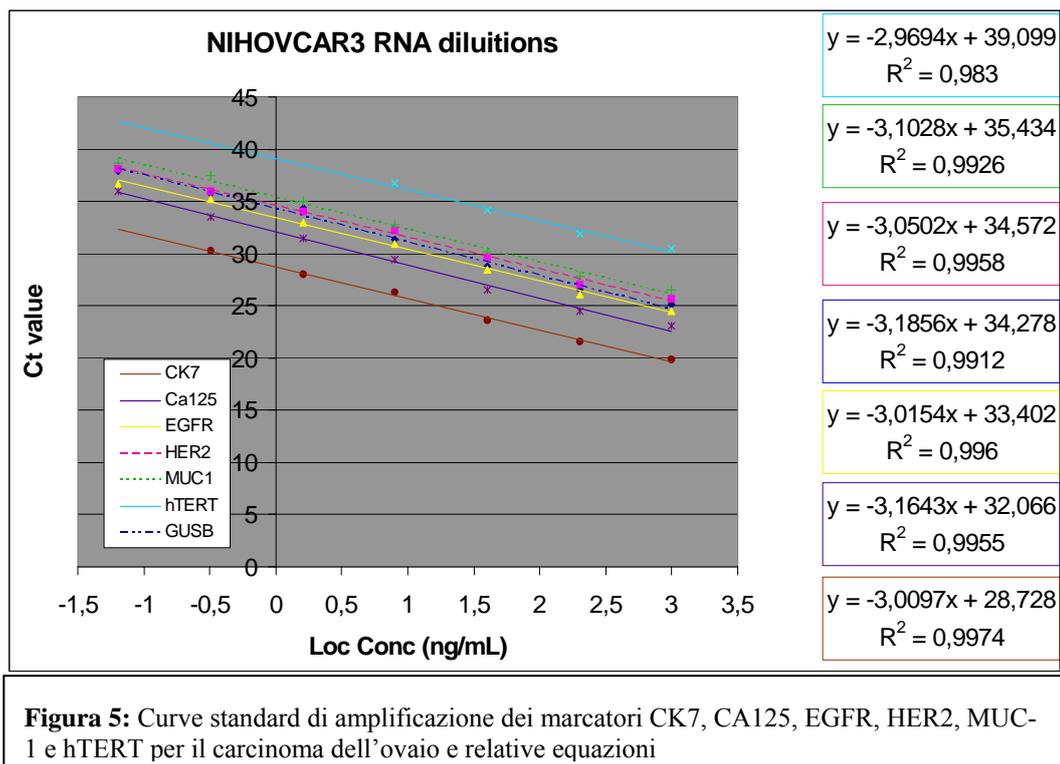
**Figura 4:** Curve standard di amplificazione dei marcatori hMAM, EGFR e MUC-1 per il carcinoma della mammella e relative equazioni

## COSTRUZIONE DELLE CURVE STANDARD X L'ANALISI DEI MARCATORI DEL CARCINOMA DELL'OVAIO

Dopo aver verificato che le cellule NIH-OVCAR3 esprimono i marcatori HER2, EGFR, CK7, MUC1, CA125 e hTERT in quantità non elevate e quindi non adeguate ad ottenere curve di calibrazione aggiungendo tali cellule al sangue di donatori sani, si è scelto di costruire le curve

standard attraverso diluizioni seriali 1:5 di RNA estratto da cellule NIH-OVCAR3 (a partire dallo stock di  $1 \cdot 10^6$  cells/mL). L'RNA estratto è stato retrotrascritto mediante RT-PCR e quantificato in PCR Real-Time. Le curve standard sono state ottenute analizzando campioni alle seguenti concentrazioni:

1000 ng, 200 ng, 40 ng, 8 ng, 1.6 ng, 3.2 ng, 0.064 ng di RNA dallo Stock NIH-OVCAR3. Utilizzando i valori di  $C_T$  ottenuti per ciascun campione sono state costruite le curve standard riportate in figura 5.



### PREPARAZIONE DELLE CELLULE MDA-MB 453 e NIH-OVCAR3

Le cellule MDA-MB 453 e NIH-OVCAR3, impiegate per la costruzione delle curve standard descritte precedentemente, sono state coltivate in terreno di coltura RPMI supplementato con 100 U/ml di penicillina, 100µg/ml di streptomina (complessivamente indicato come DMEM) e 10%-20% di siero bovino fetale (Fetal Calf Serum, FCS, Invitrogen) scomplementato a 56°C per 30 minuti. Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C con atmosfera umidificata (5% di CO<sub>2</sub>). Il trapianto effettuato prima di aggiungere le cellule al sangue intero è stato eseguito utilizzando EGTA 5mM in tampone fosfato salino (Phosphate Buffered Salin, PBS 1X: NaCl 120mM, KCl 2,7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, pH 7,4; Sigma Chemicals Co., St. Louis) per permettere la preservazione degli antigeni presenti sulla membrana cellulare. La conta delle cellule vitali della linea cellulare è stata effettuata al microscopio ottico, utilizzando un emocitometro di tipo Neubauer

e una soluzione diluita di Trypan Blue (0,4% w/v) (Sigma). La conta delle cellule è stata stimata adottando la formula:  $C \times 10^4 \times D / Sq = \text{cellule per ml}$  (dove C = n° di cellule contate per ogni quadrato grande; D = fattore di diluizione e Sq = n° di quadrati grandi contati)

## **ANALISI STATISTICA**

I valori ottenuti sono riportati come numeri (%) o media  $\pm$  deviazione standard (SD) e range (valore minimo - valore massimo). La sopravvivenza è stata calcolata in mesi a partire dal prelievo basale, cioè prima dell'inizio della terapia.

Per confrontare variabili continue sono stati utilizzati test non parametrici quali Mann-Whitney test e Wilcoxon test, mentre per le variabili categoriche sono stati utilizzati il test del Chi Quadro o il Fisher Exact test. La sensibilità e specificità del FPDNA è stata valutata mediante analisi della curva ROC (Receiver Operating Characteristic) rispetto ai controlli sani. Per valutare la sopravvivenza libera da progressione di malattia (PFS, Progression Free Survival) e la sopravvivenza complessiva (OS, Overall Survival), sono state costruite curve di Kaplan-Meier e la significatività è stata valutata mediante Log-rank test.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma SPSS 10.0, ed i risultati sono stati considerati significativi per valori di  $p < 0.05$ .

# RISULTATI

## DETERMINAZIONE DEL CUT-OFF DI NORMALITA'

### FPDNA

Per valutare la concentrazione di FPDNA normalmente circolante negli individui, sono stati analizzati 50 campioni di sangue intero ottenuti da altrettanti donatori sani di sesso femminile (età media 42 anni, range 35-62 anni) afferenti al Centro Trasfusionale del Policlinico S.Orsola-Malpighi.

La concentrazione media di FPDNA misurata nei controlli sani è stata di  $6.4 \pm 4.0$  ng/mL (range 0.7-16.5). Il valore soglia (cut-off) per definire la positività a tale marcatore è stato calcolato sommando alla media due volte il valore della deviazione standard, ed è stato fissato a 14.5 ng/mL.

### CTC

Per la determinazione del valore soglia dei singoli marcatori scelti, sono stati precedentemente raccolti, processati e analizzati, campioni di sangue relativi a 30 donatori sani di sesso femmile, afferenti anch'esse al Centro Trasfusionale del Policlinico S.Orsola-Malpighi.

Analisi da buffy coat:

- espressione di hMAM: tutti i campioni dei controlli sani sono risultati negativi, quindi non è stato necessario definire nessun cut-off.
- espressione di CK19, CK7, HER2, MUC1, EGFR, CA125, hTERT: tutti i controlli sani hanno fornito risultati positivi. Tuttavia, poiché la Ck19 ha mostrato un range d'espressione ristretto (0.026-0.175 AU/ml), è stato possibile definire un valore di cut-off (0.19 AU/mL), calcolato come media più 3 deviazioni standard. La Ck7 ha mostrato un range d'espressione un po' meno definito ma, data l'assenza di altri marcatori utilizzabili nelle pazienti con tumore dell'ovaio, è stata comunque considerata ai fini dell'analisi di questo gruppo di pazienti (fissando il cut-off a 0,6 AU/mL, media più 3 deviazioni standard). Gli altri marcatori, invece, dato l'alto livello di trascritti illegittimi e l'ampia eterogeneità osservata negli individui sani, sono stati considerati inadeguati per la quantificazione in Real-Time PCR a partire da buffy coat e sono stati valutati solo dopo arricchimento magnetico.

Analisi dopo arricchimento immunomagnetico:

- espressione di hMAM, CK19, CK7, EGFR, CA125: tutti i campioni dei controlli sani sono risultati negativi, quindi non è stato necessario definire nessun cut-off.

- espressione di HER2, MUC1 e hTERT: essendo stato osservato un livello basale di espressione di tali marcatori, è stato definito un cut-off calcolato come media più 3 deviazioni standard, fissato, per il carcinoma della mammella, a 12.54 CTC/mL per HER2 e a 2.67 ng/mL per MUC1; mentre per il carcinoma dell'ovaio a 4.69 ng/mL per HER2, 0.15 ng/mL per MUC1 e 2.38 ng/mL per hTERT.
- Espressione di GUSB: l'espressione di questo gene costitutivo è stata utilizzata non per la quantificazione dei risultati (poichè è stata scelta una quantificazione di tipo assoluto, Ct vs log C) ma per valutare l'attendibilità dei risultati ottenuti dopo procedura immunomagnetica. In particolare, sono state considerate attendibili solo le reazioni in cui il valore del C<sub>T</sub> di GUSB è stato tra 28.5 e 32.5. Infatti, valori di C<sub>T</sub> più elevati possono derivare da problematiche insorte nella processazione del campione con le biglie magnetiche e portare a falsi negativi. Al contrario, nei campioni con un C<sub>T</sub> <28.5, i marcatori HER-2, MUC-1 ed hTERT (per i quali è presente un valore soglia anche dopo arricchimento) tendono ad essere maggiormente positivi, e c'è quindi il rischio di incorrere in falsi positivi.

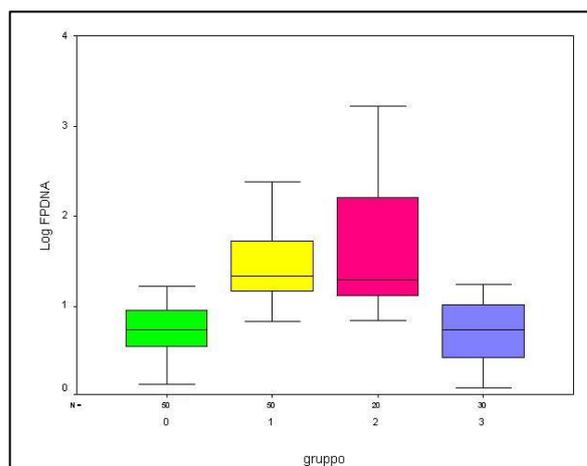
## **1 PAZIENTI CON CARCINOMA DELLA MAMMELLA METASTATICO**

### **1.1 QUANTIFICAZIONE DEL DNA LIBERO PLASMATICO**

#### **FPDNA AL PRELIEVO BASALE**

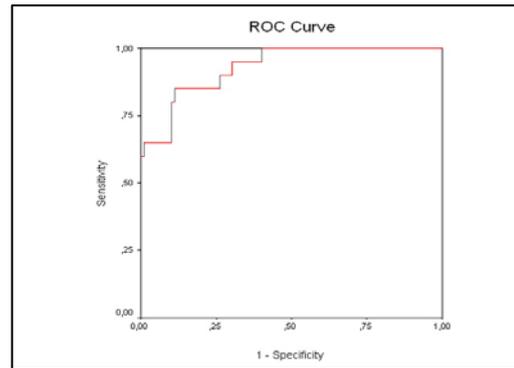
La concentrazione media di FPDNA misurata al momento del prelievo basale è stata 210.2±421 ng/mL, con un range di variabilità compreso tra 6.9-1659 ng/mL. Tale concentrazione è risultata statisticamente più elevata rispetto al gruppo dei 50 controlli sani (p<0,001 Mann-Whitney test). (vedi figura 6)

In particolare, delle 20 pazienti analizzate, 13 (65%) hanno mostrato valori superiori al cut-off (range 17.3 – 1659 ng/mL).



**Figura 6:** Boxplot delle concentrazioni di FPDNA nei controlli sani (in verde-gruppo 0), nelle pazienti con carcinoma dell'ovaio (giallo-gruppo1), con carcinoma della mammella metastatico (fucsia- gruppo2) e localizzato (viola-gruppo3) al prelievo basale

La sensibilità e la specificità di tale marcatore al momento della diagnosi, valutate mediante analisi della curva ROC, sono risultate rispettivamente 65% e 94% (AUC 0.939, AUC 95% c.i. 0.883-0.995). (vedi figura 7)

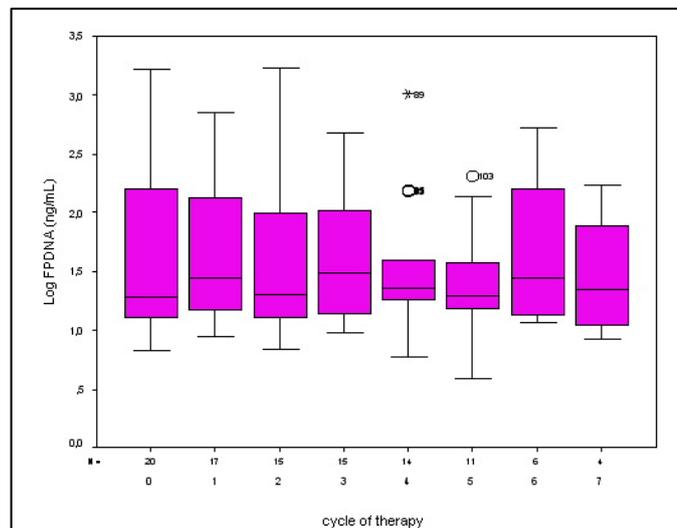


e

**Figura 7:** curva ROC per le concentrazioni di FPDNA nel gruppo di controllo e nelle pazienti con carcinoma della mammella metastatico.

### FPDNA DURANTE LA TERAPIA

L'andamento medio della concentrazione di FPDNA durante il trattamento chemioterapico non ha mostrato variazioni statisticamente significative, mostrando livelli superiori al cut-off nella maggior parte delle pazienti. (figura 8)



**Figura 8:** Boxplot rappresentanti il log della concentrazione di FPDNA nella pazienti metastatiche durante i cicli di terapia

## 1.2 QUANTIFICAZIONE DELLE CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI

### CTC AL PRELIEVO BASALE

All'analisi da buffy coat effettuata sui campioni ottenuti al momento dell'arruolamento nello studio, 15/20 (75%) pazienti sono risultate positive per il marcatore CK19 e 9/20 (45%) al marcatore hMAM. Le pazienti positive per entrambi i marcatori sono state 6/20( 30%), mentre 18/20 (90%) erano quelle positive per almeno uno dei due marcatori.

Dopo la procedura di arricchimento immunomagnetico, invece, 16/20 (80%) pazienti sono risultate positive per CK19, 9/20 (45%) per hMAM, 11/20 (55%) per CK7, 2/20 (10%) per HER2, 2/20 (10%) per EGFR e 10/20 (50%) per MUC1. Solo una paziente è risultata positiva a tutti i marcatori. Complessivamente, 17/20 (85%) pazienti sono risultate positive ad almeno un marcatore e la

combinazione di CK19 e hMAM è quella che fornisce la miglior sensibilità per l'individuazione delle CTC (17/20 pts).

La maggior parte delle pazienti positive per la CK19 all'analisi da buffy coat (13) si sono confermate positive anche dopo l'arricchimento. Tre pazienti, con un'espressione sotto il cut-off da buffy coat, sono risultate positive dopo arricchimento, mentre due pazienti positive alla prima analisi da buffy coat sono risultate negative alla seconda metodica. Tali discrepanze possono trovare una spiegazione nella selezione positiva volta proprio all'arricchimento specifico in cellule di origine epiteliale della procedura immunomagnetica, nel primo caso, e nell'eliminazione del trascritto illegittimo derivante dai linfociti, nel secondo.

Le pazienti positive ad hMAM sono state 9, ed esattamente le stesse con entrambe le metodiche (buffy coat e arricchimento).

### CTC DURANTE LA TERAPIA

Durante il trattamento chemioterapico, il numero di pazienti positive alle CTC è rimasto pressoché costante, anche se sono state osservate variazioni nei livelli di espressione dei singoli marcatori, CK19 e hMAM, tra un ciclo e l'altro di terapia. Complessivamente, 19/20 (95%) pazienti hanno mostrato positività ad almeno uno dei due marcatori. In dettaglio: una paziente è rimasta sempre negativa a tutti i marcatori durante l'intero periodo di osservazione; una paziente, negativa al basale, è diventata positiva per la CK19 nel follow up, mentre 2 pazienti inizialmente positive solo per la CK19 hanno poi mostrato positività anche per hMAM.

L'andamento dei marcatori CK19 e hMAM dopo arricchimento immunomagnetico è stato sovrapponibile a quello ottenuto da buffy coat. Per quanto riguarda gli altri marcatori, si segnala soltanto un aumento di positività per HER2 ed EGFR: 3/20 pazienti sono risultate positive per HER2 e 4/20 per EGFR, quindi, rispettivamente una e due pazienti in più del basale.

### 1.3 CARATTERISTICHE CLINICHE E ISTOLOGICHE

La risposta alla terapia, valutata dopo i primi 3-4 cicli di chemioterapia, è stata la seguente: nessuna paziente (0%) ha mostrato una risposta completa, 4 (20%) hanno mostrato una risposta parziale e 3 (15%) una situazione stazionaria. Delle restanti pazienti, 10 (50%) hanno avuto una progressione, una (5%) è deceduta, una (5%) è uscita volontariamente dallo studio mentre di un'altra (5%) il dato non era disponibile.

Durante l'intero periodo di studio (range 2 -25 mesi), 17/20 (85%) pazienti hanno mostrato una progressione di malattia, con un tempo medio libero da progressione di malattia (PFS, Progression

free Survival) pari a 7.2 mesi, range 1-19 mesi. La sopravvivenza media complessiva (OS, overall survival) è stata invece di 11.7 mesi (range 2-25 mesi) e 11/20 pazienti (55%) sono decedute.

Per quanto riguarda i marcatori sierici usati in routine, al prelievo basale 15/20 (75%) pazienti erano positive al CEA (media  $44.7 \pm 84.5$  ng/mL, range 1-300) e 13/20 (65%) positive al CA15.3 (media  $470.2 \pm 722.5$  U/mL, range 10-2930).

#### 1.4 FPDNA, CTC, ISTOLOGIA E CLINICA

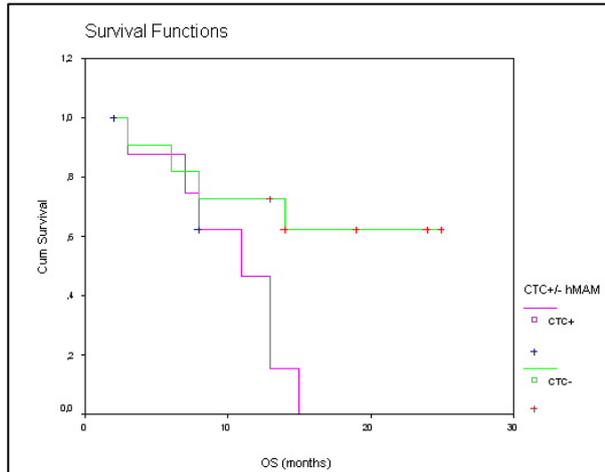
Per valutare il possibile ruolo prognostico e/o predittivo di FPDNA e delle CTC nelle pazienti con carcinoma metastatico, i risultati ottenuti al prelievo basale sono stati confrontati con i parametri clinici e la sopravvivenza delle pazienti.

La PFS nei due gruppi di pazienti con valori di FPDNA inferiori o superiori al cut-off al prelievo basale è risultata molto simile (valore medio 7.23 vs 7.14 mesi), mentre una maggior OS è stata osservata nelle pazienti con bassi valori di FPDNA (media 15.86 mesi vs 9.46 mesi). Tuttavia il dato non è risultato essere statisticamente significativo (Log rank test  $p=0,4$ ),

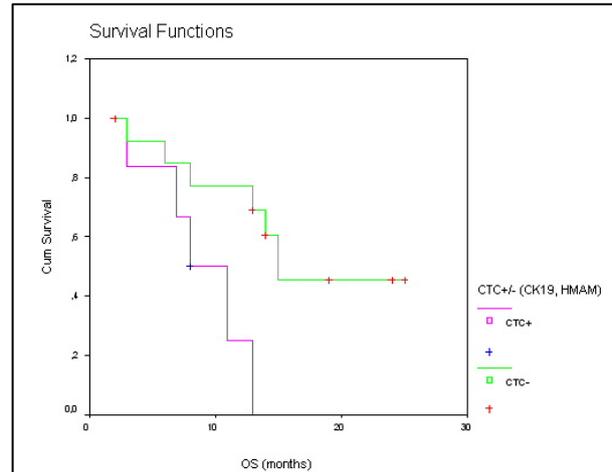
E' invece stata osservata un'associazione significativa tra alti valori di FPDNA dopo 3 cicli di terapia e risposta clinica alla terapia, valutata in corrispondenza del medesimo intervallo di tempo ( $p=0.038$  Fisher's exact test;  $p=0.05$  Linear by Linear association). In particolare, 4 delle 7 pazienti che hanno mostrato una risposta parziale o una fase stazionaria della malattia (RT 2 e 3) avevano valori di FPDNA inferiori al cut-off nel prelievo corrispondente, mentre 11 delle 12 pazienti in progressione o decedute (RT 4 e 5) hanno mostrato valori di FPDNA superiori al cut-off.

Relativamente alle CTC, è stato osservato che tutte le 11 pazienti decedute erano positive ad almeno uno dei due marcatori al prelievo basale; più precisamente: 2 erano positive solo ad hMAM, 4 solo alla CK19 e 5 ad entrambi i marcatori. La positività ai marcatori (presi singolarmente o combinati) è stata messa in relazione con la sopravvivenza. Ne è emerso che la positività ad hMAM o ai due marcatori (CK19 e hMAM) al momento del prelievo basale, si associa in modo significativo ad una peggior prognosi (Log rank test  $p=0.03$  e  $p=0.018$ , rispettivamente). (figure 9 e 10) La media di OS nei due gruppi risulta di 8.89 mesi (range 2-15) vs 14 mesi (range 3-25) per le pazienti hMAM positive, e 8.3 mesi (range 3-13) vs 13.1 mesi (range 2-25) per quelle positive ad entrambi i marcatori.

Al contrario la positività al solo marcatore CK19 o ad almeno uno dei due marcatori, non si traduce in un minor tempo di sopravvivenza ( $p=n.s.$  in entrambi i casi, Log rank test.).



**Figura 9:** Curve di Kaplan Meier per la sopravvivenza (OS) in pazienti positive e negative per le CTC al marcatore hMAM (Log rank test  $p=0,03$ )



**Figura 10:** Curve di Kaplan Meier per la sopravvivenza (OS) in pazienti positive e negative per le CTC ai marcatori hMAM e CK19 (Log rank test  $p=0,018$ )

La presenza di CTC al prelievo basale (positività ad hMAM e CK19 o ai singoli marcatori) non sembra aver alcun significato in termini di sopravvivenza libera da progressione di malattia (PFS) ( $p=n.s.$  in tutti i casi, Log rank test).

Per quanto riguarda il monitoraggio durante la terapia, non è stata rilevata nessuna associazione significativa tra la presenza di CTC dopo i primi tre cicli e la risposta clinica alla terapia. Infatti, sebbene tutte le pazienti (12/12) non responsive (RT4 e 5) siano risultate positive per le CTC, tra le 7 pazienti con risposta parziale o in fase stazionaria (RT2 e 3) soltanto 2 sono risultate negative a tale marcatore.

Analizzando invece l'andamento delle CTC nelle singole pazienti in relazione alla progressione di malattia, è stata rilevata una concordanza tra alti livelli di CTC e andamento clinico. Infatti, nel prelievo corrispondente alla data di progressione (o antecedente a questa, nei casi in cui il campionamento era terminato prima) sono stati misurati valori elevati di CK19 in 13/16 (81.3%) pazienti e di hMAM 10/16 (62.5%) pazienti.

Lo valutazione dei due biomarcatori oggetto di studio nel contesto degli altri parametri clinico-istologici (numero di metastasi maggior di 3, livelli di CEA e CA15.3)) non ha mostrato nessuna associazione significativa, e non è stata evidenziata nessuna relazione nemmeno tra alti livelli di FPDNA e presenza di CTC, sia al prelievo basale che durante il trattamento.

## 2 PAZIENTI CON CARCINOMA DELLA MAMMELLA LOCALIZZATO-LOCALMENTE AVANZATO (ARIANNA 01)

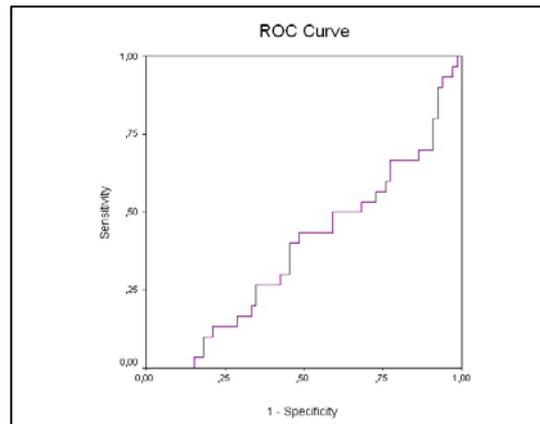
### 2.1 QUANTIFICAZIONE DEL DNA LIBERO PLASMATICO

#### FPDNA AL PRELIEVO BASALE

La concentrazione media di FPDNA misurata al momento del prelievo basale è stata  $10.3 \pm 13.7$  ng/mL, con un range di variabilità compreso tra 1.2-66.7 ng/mL; tale concentrazione non è risultata essere significativamente diversa da quella del gruppo di controllo ( $p=0.921$ , Mann-Whitney test). (figura 6)

Al momento della diagnosi, 7/40 (17.5%) pazienti hanno mostrato valori superiori al cut-off (range 15.9-66.7 ng/mL).

La sensibilità e la specificità di tale marcatore al momento della diagnosi, valutate mediante analisi della curva ROC, sono risultate rispettivamente 17.5% e 94% (AUC 0.493, AUC 95% c.i. 0.354-0.633). (vedi figura 11)

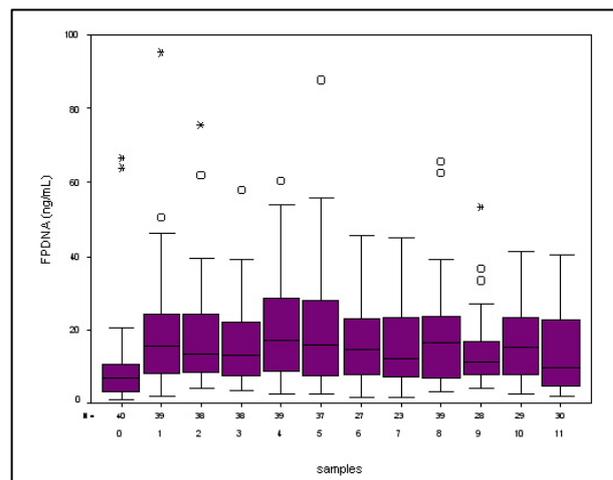


**Figura 11;** curva ROC per le concentrazioni di FPDNA nel gruppo di controllo e nelle pazienti con carcinoma della mammella localizzato.

#### FPDNA DURANTE LA TERAPIA

Dopo la somministrazione del primo ciclo di chemioterapia neoadiuvante, in tutte le pazienti è stato osservato un significativo aumento dei livelli di FPDNA rispetto al prelievo basale ( $p < 0,001$ , Wilcoxon test). Nei cicli successivi sono state registrate singole variazioni nei livelli di FPDNA tra una paziente e l'altra, ma i livelli medi si sono mantenuti pressoché costanti. Al termine della terapia, 23/40 (57.5%) pazienti avevano livelli di FPDNA superiori al cut-off (media  $23 \pm 26$  ng/mL, range 3.25-130.5).

L'andamento del FPDNA è rappresentato in figura 12.



**Figura 12:** Boxplot rappresentanti la concentrazione di FPDNA nella pazienti ARIANNA 01 in tutti i prelievi esaminati (0=basale; 1-8= dopo ogni ciclo di chemioterapia neoadiuvante; 9-11=24 ore, 10 giorni e 1mese dopo intervento)

Anche nei prelievi in corrispondenza dell'intervento chirurgico (24 ore) e poco dopo (14 giorni e 1 mese), non sono state osservate variazioni significative di FPDNA.

## 2.2 QUANTIFICAZIONE DELLE CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI

### CTC AL PRELIEVO BASALE

Prima dell'inizio della terapia (prelievo basale) sono risultate positive ad almeno uno dei due marcatori, Ck19 e hMAM, 17 pazienti su 40 (42.5%) mediante l'analisi da buffy coat. Di queste 17 pazienti, 11 erano positive solo alla CK19 mentre 6 ad entrambi i marcatori.

All'analisi con arricchimento magnetico sono invece risultate positive solo 8 pazienti su 40 (20%), di cui 6 ad entrambi i marcatori CK19 e hMAM, mentre 2 solo per hMAM. (\*)

In dettaglio, confrontando le due metodiche, 20 pazienti sono risultate sempre negative e 6 positive in entrambe le analisi. ( $p=0,025$ ).

### CTC DURANTE LA TERAPIA

Durante il trattamento di chemioterapia neoadiuvante e subito dopo l'intervento chirurgico (24 ore e 14 giorni) sono state osservate fluttuazioni nei livelli di CTC e nel numero totale di pazienti positive/negative a tale marcatore; tuttavia, non è stato possibile individuare un andamento generale ascrivibile a tutte le pazienti.

Al termine della terapia neoadiuvante 16/38 (42%) pazienti sono risultate positive per la presenza di CTC; di queste, una era positiva per entrambi i marcatori (CK19 e hMAM), mentre le restanti 15 solo per il marcatore CK19.

Complessivamente, nelle 38 pazienti monitorate durante l'intero iter di chemioterapia neoadiuvante, sono state osservate le seguenti variazioni:

- 15 pazienti sono risultate negative sia al basale che al termine della terapia;
- 7 pazienti, inizialmente positive, si sono negativizzate;
- 8 pazienti, negative al basale, sono poi risultate positive al termine della terapia;
- 8 pazienti sono sempre state positive per le CTC

---

\* I risultati ottenuti con le due metodiche risultano fortemente discordanti e risolvono il problema, ancora irrisolto, della scelta della metodologia più adatta per l'identificazione delle CTC. Tuttavia, in considerazione dell'esiguo numero di CTC in circolo, del fatto che le due metodiche sono state applicate a provette di sangue differenti e della possibile bassa espressione di molecole BerEP4 sulla superficie delle CTC (legata verosimilmente al processo di Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT) sono stati privilegiati i risultati ottenuti con l'analisi da buffy coat.

### 2.3 CARATTERISTICHE CLINICHE E ISTOLOGICHE

Complessivamente, durante il periodo di osservazione (range 8 -58 mesi), 14/40 (35%) pazienti hanno mostrato una progressione di malattia, mentre il tempo medio libero da progressione di malattia (PFS, Progression free Survival) è stato pari a 25.8 mesi, range 4-58 mesi. La sopravvivenza media complessiva (OS, overall survival) è stata di 32.4 mesi (range 8-58 mesi) e 8/40 pazienti (20%) sono decedute.

Delle 40 pazienti arruolate, 38 (95%) hanno completato l'iter di chemioterapia neoadiuvante e sono state sottoposte ad intervento chirurgico di quadrantectomia (22 casi) o di mastectomia (16 casi) con linfadenectomia, mentre 2 pazienti (5%) non sono state operate a causa della mancata riduzione dell'estensione locale della neoplasia. La risposta patologica al trattamento è stata valutata sui campioni chirurgici post-chemioterapia ed è riportata nella tabella seguente (tabella 6). In sintesi, 4 pazienti (10%) hanno mostrato una risposta patologica completa (GRT 5 e GRL A-D), 11 pazienti (27.5%) una risposta patologica parziale (GRT 4 e GRL A-D-C) mentre 20 pazienti (50%) non hanno mostrato risposta (GRT 1,2,3 e GRL A-B-C); infine, per 5 pazienti non è stato possibile valutare la risposta (2 pazienti non operate e 3 pazienti operate presso un'altra struttura).

		GRT					
		5	4	3	2	1	nv
GRL	A	2	3		2	2	
	D	2	3				
	B			3	3		
	C		5	7	3		
	nv						5

**Tabella 6** Schema di valutazione della Risposta Patologica: sono evidenziati in verde i pts con risposta patologica completa, in arancione quelli con risposta parziale e in rosso i non- responsivi. (GRT= grado di regressione del tumore; GRL= grado di regressione dei linfonodi; nv= non valutabile)

#### **Caratterizzazione Istopatologica**

La valutazione dei parametri istologici e molecolari è stata effettuata su 39 biopsie pre-trattamento chemioterapico e su 37 campioni post-trattamento (di una paziente, essendo stata operata presso un'altra struttura, non è stato possibile reperire il materiale istologico.). L'analisi istologica delle biopsie pre-trattamento ha evidenziato 27 casi di carcinoma duttale infiltrante, 1 carcinoma lobulare infiltrante e 11 casi con istotipo NAS. Relativamente al grado di differenziazione sono invece stati

riscontrati 3 casi G1, 12 casi G2 e 10 casi G3; in 14 casi non è stato possibile valutare il grado. Nei campioni operatori post-trattamento, in 28 casi è stato rilevato un carcinoma duttale infiltrante, in 3 casi un carcinoma lobulare e in 6 casi non è stato possibile definire l'istotipo; il grado istologico rilevato è stato G1 in 6 casi, G2 in 19 casi, G3 in 11 casi e in un caso non valutabile.

Sia sulle biopsie pre-trattamento che sui pezzi operatori, sono stati valutati, mediante analisi immunohistochimica, i recettori per gli estrogeni (ER) e per il progesterone (PgR), l'indice di proliferazione cellulare (Ki-67), i recettori HER2 ed EGFR. In base ai risultati ottenuti i campioni sono stati quindi classificati nei 4 sottotipi molecolari Luminal A, Luminal B, HER2 e Tripli Negativi. Nelle biopsie pre-trattamento sono risultati: 4 Luminal A, 20 Luminal B, 4 HER2 e 11 Tripli Negativi; nei campioni post-terapia sono invece stati evidenziati: 11 Luminal A, 10 Luminal B, 7 HER2 e 8 Tripli Negativi. Nei 35 casi in cui la valutazione è stata effettuata sia sul pezzo pre- che sul pezzo post-terapia, non state riscontrate differenze statisticamente significative, e la concordanza è stata discreta ( $\kappa=0,46$ ).

Il gene HER2 è risultato iperespresso e/o amplificato in 9/39 (23%) campioni bioptici e in 10/36 (27.8%) dei pezzi operatori.

### **Marcatori sierici (CEA e CA15.3)**

Per quanto riguarda i marcatori sierici usati nella routine clinica, al momento della diagnosi 7/40 (17.5%) pazienti erano positive per CEA e 12/40 (30%) per CA15.3, mentre al termine della chemioterapia, 6/38 (15.7%) erano positive per CEA e 10/38 (26.3%) per CA15.3. Durante il trattamento neoadiuvante si è registrata una generale diminuzione dei valori medi di entrambi i marcatori, diminuzione che è risultata statisticamente significativa dopo il primo ciclo per CA15.3 e dopo il secondo per CEA ( $p=0,02$  e  $p=0,01$ , Wilcoxon test, rispettivamente). Inoltre, nel prelievo immediatamente successivo all'intervento chirurgico (24 ore dopo) è stata registrata un'ulteriore significativa riduzione dei due marcatori sierici ( $p<0,001$  per entrambi, Wilcoxon test).

## **2.4 FPDNA, CTC, ISTOLOGIA E CLINICA**

Lo studio del FPDNA e delle CTC nel contesto dei parametri clinici, isto-patologici e dei marcatori sierici attualmente in uso nella pratica clinica, ha portato ad alcune osservazioni degne di nota.

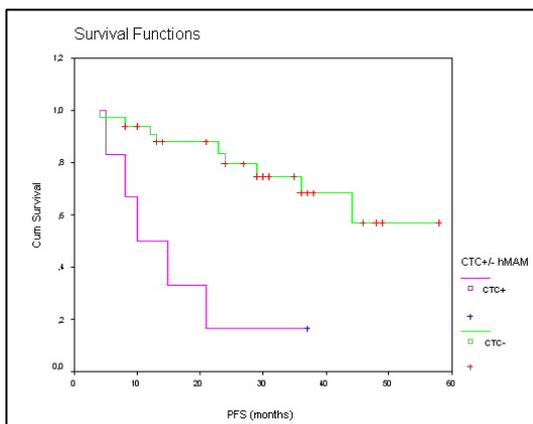
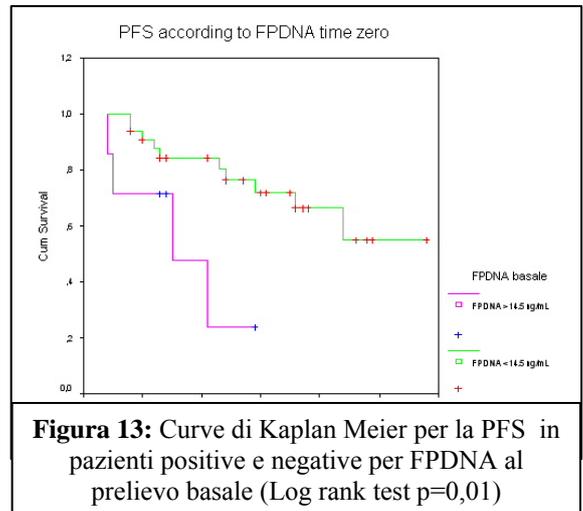
Al prelievo basale (quindi prima dell'inizio della terapia) è stata osservata una correlazione tra alti livelli di FPDNA e presenza di CTC: 6 pazienti sono risultate positive a tutti e due biomarcatori mentre 22 negative per entrambi ( $p=0,029$ , Fisher exact test).

Per quanto concerne il FPDNA, è stato notato che pazienti con livelli superiori alla norma al prelievo basale presentano un intervallo di tempo di sopravvivenza libera da progressione di

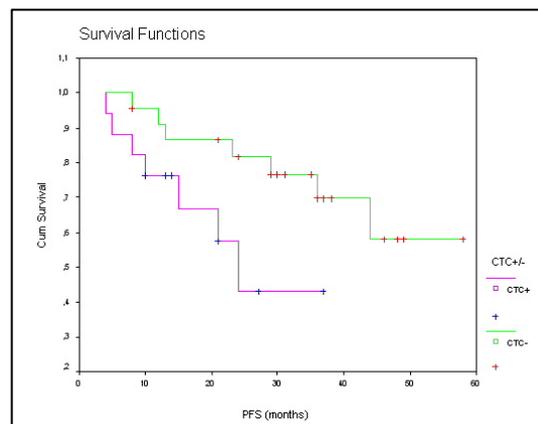
malattia ridotto rispetto alle pazienti con livelli inferiori al cut-off (14.4 vs 28.2 mesi, range 4-29 vs 8-58). Come osservato dalla curva di Kaplan-Meier, l'associazione tra FPDNA al basale e PFS risulta essere statisticamente significativa ( $p=0,01$  Log rank test) (figura 13)

Non è stata invece trovata nessuna associazione significativa tra alti valori di FPDNA alla diagnosi e OS ( $p=n.s.$ )

Anche la presenza di CTC al prelievo basale (evidenziata come positività al singolo marcatore hMAM o ad almeno uno dei due marcatori considerati) si associa in modo significativo ad una ridotta PFS ( $p=0,005$  e  $p=0,05$ , rispettivamente, Log rank test), ma non alla OS. (figure 14 e 15)

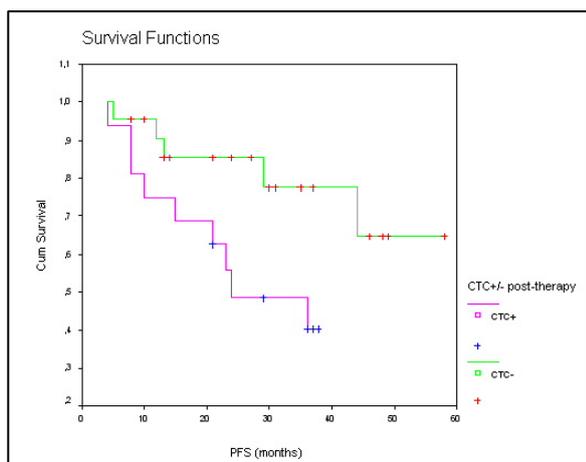


**Figura 14:** Curve di Kaplan Meier per la PFS in pazienti positive e negative per CTC al marcatore hMAM, al prelievo basale (Log rank test  $p=0,005$ )

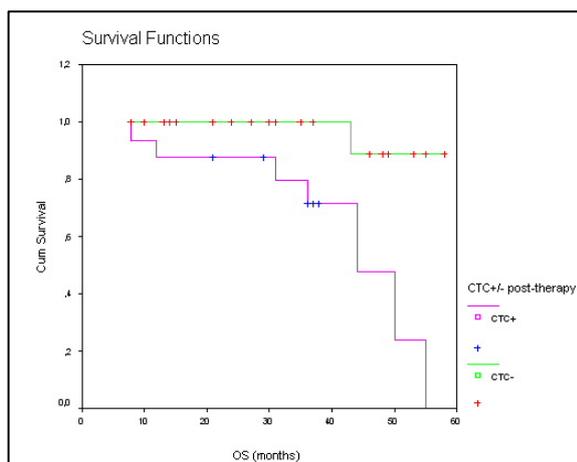


**Figura 15:** Curve di Kaplan Meier per la PFS in pazienti positive e negative per CTC (almeno un marcatore) al prelievo basale (Log rank test  $p=0,05$ )

La rivalutazione dei due biomarcatori al termine dei 6-8 cicli di chemioterapia, se da un lato non ha portato nessuna informazione aggiuntiva legata al FPDNA, dall'altro ha mostrato l'esistenza di un'associazione tra le CTC e la prognosi. Infatti, pazienti positive per le CTC (positività ad almeno uno dei due marcatori studiati) al termine della terapia, mostrano un ridotto tempo di PFS e una peggior OS rispetto alle pazienti negative ( $p=0,039$  e  $p=0,0039$ , Log rank test) (figura 16 e 17)

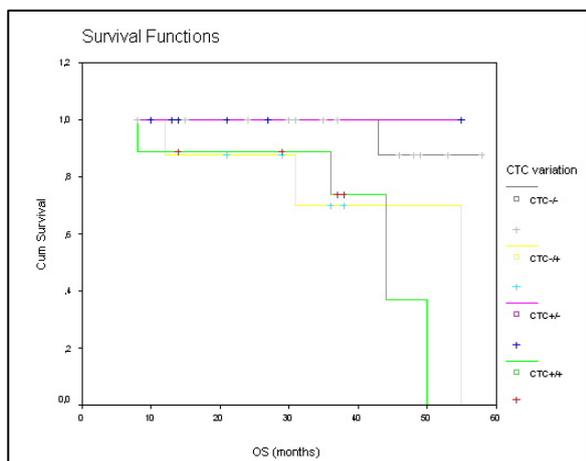


**Figura 16:** Curve di Kaplan Meier per la PFS in pazienti positive e negative per CTC (almeno un marcatore) al termine della terapia neoadiuvante (Log rank test  $p=0,039$ )

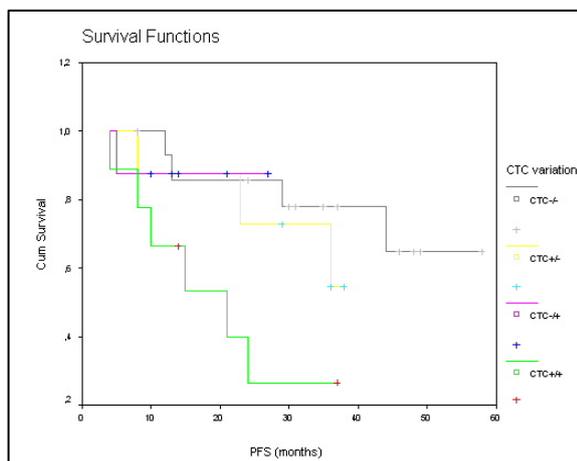


**Figura 17:** Curve di Kaplan Meier per la OS in pazienti positive e negative per CTC (almeno un marcatore) al termine della terapia neoadiuvante (Log rank test  $p=0,0039$ )

Studiando la variazione delle CTC durante la terapia neoadiuvante (prima e dopo) rispetto alla sopravvivenza (PFS e OS), è stato osservato un trend di correlazione. In particolare, pazienti sempre negative per le CTC mostrano la miglior PFS e OS (34 e 38 mesi), seguite dalle pazienti che si sono negativizzate in corso di terapia (28.6 e 32.5 mesi, rispettivamente). Al contrario, pazienti sempre positive o che sono diventate positive durante la terapia, mostrano i valori peggiori di PFS e OS (18.8 e 15.5, 32.5 e 21.7 mesi) (figure 18 e 19)



**Figura 18:** Curve di Kaplan Meier per la OS rispetto alla variazione di positività in CTC osservata tra prima e dopo la terapia



**Figura 19:** Curve di Kaplan Meier per la OS rispetto alla variazione di positività in CTC osservata tra prima e dopo la terapia

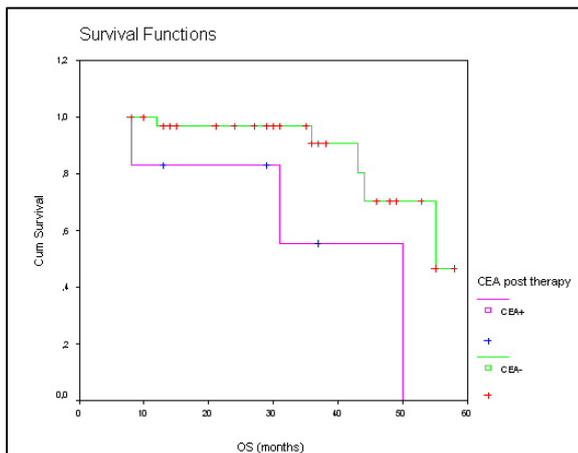
Considerando i parametri clinici isto-patologici, la presenza di CTC e di alti livelli di FPDNA alla diagnosi si associa ad una maggior estensione del tumore (T) ( $p=0.02$  per entrambi, linear by linear association) e alla presenza di metastasi a distanza (M) ( $p=0.03$  e  $P=0.02$ , rispettivamente) (vedi

tabella 7). La positività per le CTC alla diagnosi, inoltre, correla con l'iperpressione/amplificazione del gene HER-2 ( $p=0,009$ , Fisher exact test)

Infine, confrontando i marcatori sierici comunemente usati in routine con CTC e FPDNA, è stata osservata un'associazione tra la presenza di CTC e alti livelli di CEA al prelievo basale ( $p=0,029$ , chi quadro) e tra alti livelli di FPDNA e positività per CA15.3 ( $p=0,017$ , chi quadro), anch'essa al prelievo basale.

Tra i due marcatori sierici in uso nella pratica clinica, solo il CEA sembra aver un ruolo prognostico: infatti, pazienti con valori di CEA superiori alla cut-off al termine del trattamento neoadiuvante mostrano una peggior OS. ( $p=0,025$  Log rank test) (figura 20)

<b>Tabella 7: Caratteristiche istopatologiche e positività per CTC e FPDNA al basale</b>					
	n.	CTC basale		FPDNA basale	
		n. positivi	P	n. positivi	P
<b>Classificazione Tumore</b>			<b>0.02</b>		<b>0.02</b>
T1	1	0/1 (0%)		0/1 (0%)	
T2	16	4/16 (25%)		1/16 (6.3%)	
T3	14	7/14 (50%)		2/14 (14.3%)	
T4	9	6/9 (66.7%)		4/9 (44.4%)	
<b>Classificazione Linfonodi</b>			n.s.		n.s.
N0	14	5/14 (35.7%)		1/14 (7%)	
N1	19	8/19 (42.1%)		4/19 (21%)	
N2	5	3/5 (60%)		1/5 (20%)	
N3	2	1/2 (50%)		1/2 (50%)	
<b>Classificazione Metastasi</b>			<b>0.03</b>		<b>0.02</b>
M0	34	12/34 (35.2%)		4/34 (11.8%)	
M1 (oligometastasi)	6	5/6 (83.3%)		3/6 (50%)	
<b>CEA Basale</b>			<b>0.029</b>		n.s.
neg	33	11/33 (33%)		4/33 (12.1)	
pos	7	6/7 (85.7%)		3/7 (42.9%)	
<b>CA 15.3</b>			n.s.		<b>0.017</b>
neg	28	11/28 (39.2%)		2/28 (7.1%)	
pos	12	6/12 (50%)		5/12 (41.7%)	
<b>Iperpressione HER-2</b>			<b>0.009</b>		n.s.
neg		9/30 (30%)		4/30 (13%)	
pos		8/10 (80%)		3/10 (30%)	



**Figura 20:** Curve di Kaplan Meier per la OS in pazienti con alti e bassi livelli di CEA dopo terapia (Log rank test  $p=0.025$ )

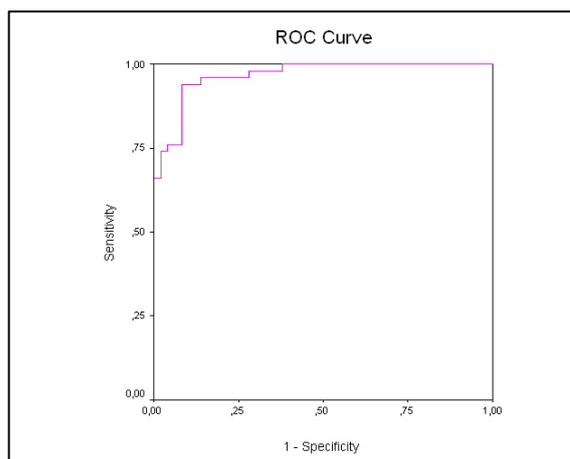
### **3 PAZIENTI CON CARCINOMA OVARICO AVANZATO (ARIANNA 02)**

#### **3.1 QUANTIFICAZIONE DEL DNA LIBERO PLASMATICO**

##### **FPDNA AL PRELIEVO BASALE**

Al momento della diagnosi (prelievo basale), 38/50 (76%) pazienti avevano un valore di FPDNA superiore al cut-off. Il livello medio di FPDNA ( $41.7 \pm 46.5$  ng/mL, range 6.74-236.86 ng/mL) è risultato essere statisticamente superiore rispetto al gruppo di controlli sani ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney test) (figura 6).

La sensibilità e la specificità di tale marcatore al momento della diagnosi, valutate mediante analisi della curva ROC, sono risultate rispettivamente 76% e 94% (AUC 0.967, AUC 95% c.i. 0.938-0.996). (figura 21)

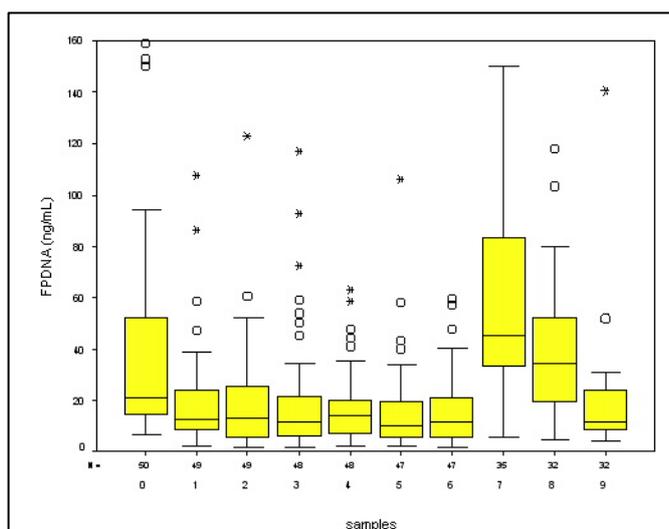


**Figura 21:** curva ROC per le concentrazioni di FPDNA nel gruppo di controllo e nelle pazienti con carcinoma dell'ovaio avanzato.

##### **FPDNA DURANTE LA TERAPIA E LA CHIRURGIA**

Al termine dei 6 cicli di terapia 24/50 (48%) pazienti avevano valori di FPDNA superiori al cut-off. I livelli medi di FPDNA durante la chemioterapia sono diminuiti in modo significativo sin dal primo ciclo e, anche al termine della terapia, sono risultati essere statisticamente inferiori rispetto al basale (media  $26 \pm 69$  ng/mL, range 1.92-481) ( $p < 0,001$  Wilcoxon test, in tutti i casi) (vedi figura 22).

Immediatamente dopo l'intervento chirurgico (24 ore), è stato osservato un brusco aumento dei livelli di FPDNA (media  $59.2 \pm 40.7$  ng/mL, range 5.9-198), significativamente più



**Figura 22:** Boxplot rappresentanti la concentrazione di FPDNA nella pazienti ARIANNA 02 in tutti i prelievi esaminati (0=basale; 1-6= dopo ogni ciclo di chemioterapia neoadiuvante; 7-9=24 ore, 10 giorni e 1 mese dopo intervento)

alti rispetto al prelievo effettuato al termine della chemioterapia ( $p < 0,001$ , Wilcoxon test). I valori

medi si sono mantenuti elevati anche nel successivo prelievo (14 giorni), mentre sono diminuiti a distanza di un mese dall'intervento (media  $23.9 \pm 36$  ng/mL, range 4.12-169.5)

### 3.2 QUANTIFICAZIONE DELLE CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI

#### CTC AL PRELIEVO BASALE

Prima dell'inizio della terapia (prelievo basale) sono risultate positive 6 pazienti su 50 (12%) mediante l'analisi da buffy coat e 10 su 30 (33.3%) all'analisi con arricchimento magnetico (positività ad almeno uno dei marcatori). Di queste 10 pazienti, 3 erano positive per CK7, 3 per MUC1, 2 per hTERT, 1 per CK7 e hTERT ed 1 per CK7, CA125 e MUC1.

Solo 1 paziente su 30 è risultata positiva per le CTC con entrambe le metodiche.

#### CTC DURANTE LA TERAPIA

Al termine dei 6 cicli di terapia 13/46 (28.2%) pazienti sono risultate positive per CK7 all'analisi da buffy coat e 5/28 (17.8%) all'analisi con arricchimento magnetico; di queste 5 pazienti, 3 erano positive per CK7 e 2 per MUC1. In generale, nei prelievi effettuati durante i cicli di chemioterapia, è stata osservata una certa variabilità nell'espressione dei marcatori tra una paziente e l'altra, con una positività più frequente per CK7 e MUC1 che, assieme ad hTERT, hanno mostrato di possedere la miglior sensibilità a livello di singolo marcatore.

Solo 2/25 pazienti sono risultate positive per le CTC con entrambe le metodiche al termine della terapia. I dati relativi alla presenza di CTC nei prelievi successivi all'intervento chirurgico non sono disponibili <sup>c</sup>

### 3.3 CARATTERISTICHE CLINICHE E ISTOLOGICHE

Delle 50 pazienti arruolate, 49 (98%) hanno completato i 6 cicli di chemioterapia neoadiuvante previsti dallo studio, mentre 1 paziente (2%) ha ricevuto solo 5 cicli di terapia.

Ventinove pazienti (58%) hanno mostrato una risposta clinica completa o parziale alla terapia (5 RT1, 18 RT2 e 9 RT3), 13 pazienti (26%) hanno mostrato riduzioni modeste della massa neoplastica o sono rimaste in una fase stazionaria (RT4) e 5 pazienti (10%) hanno avuto una progressione di malattia (RT5). Complessivamente, 37 (74%) pazienti sono state sottoposte ad

---

<sup>c</sup> In corso di studio è stata effettuata la scelta di non continuare la ricerca di CTC dopo l'intervento (24h, 10gg e 1 mese) nelle pazienti operate: tale decisione è giustificata dalla notevole invasività della procedura chirurgica per l'asportazione della massa neoplastica, che contribuisce all'immissione nel circolo ematico di numerose cellule epiteliali, portando a risultati aspecifici anche a distanza di parecchi giorni dall'intervento.

intervento chirurgico. Le restanti 13 pazienti (5 in progressione e 8 con risposta clinica alla terapia di grado 4) non state considerate idonee per l'intervento chirurgico e hanno intrapreso una seconda linea di terapia, uscendo dallo studio.

Le pazienti arruolate sono state monitorate complessivamente per un periodo (follow up) medio di 21 mesi (range 3-51), calcolato a partire dal prelievo basale. Durante questo periodo 38 pazienti (76%) hanno avuto una progressione/recidiva di malattia (tempo medio di PFS 15 mesi, range 3-41) e 22 (44%) sono decedute (tempo medio di OS 21.7 mesi, range 6-51).

La valutazione dei parametri istologici, effettuata sui 50 campioni biotici pre-trattamento chemioterapico, ha evidenziato: 34 casi di carcinoma papillare sieroso, 3 casi di carcinoma mucinoso, 4 casi di carcinoma endometrioidale e 6 casi di carcinoma scarsamente differenziato; per quanto riguarda il grado di differenziazione sono risultati: 1 caso G1, 2 casi G2 e 43 casi G3.

### **Marcatore sierico CA125**

Il cut-off per il marcatore sierico CA125 è stato fissato a 35 U/mL. Al momento della diagnosi, 49/50 pazienti (98%) avevano valori di CA125 superiori al cut-off e una sola (2%) paziente un valore leggermente inferiore (valore medio 1199 U/mL, range 29-6000 U/mL). Al termine della terapia 21/48 (43.75%) avevano ancora valori superiori al cut-off.

Durante i 6 cicli di terapia si è osservata una diminuzione statisticamente significativa dei valori medi di CA125 fin dal primo ciclo, e un'ulteriore significativa riduzione è stata registrata dopo l'intervento chirurgico (14 giorni) (in tutti i casi  $p < 0,001$ , Wilcoxon test).

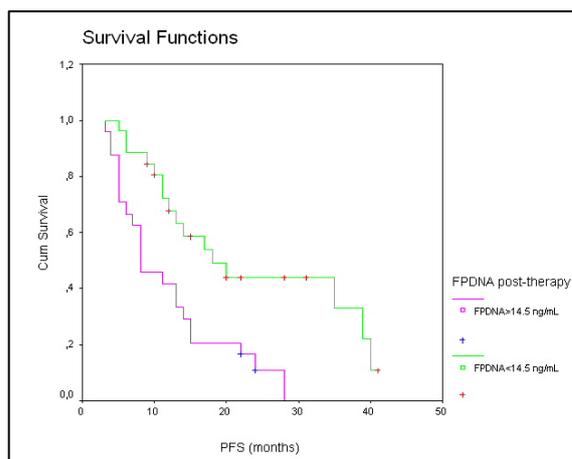
### **3.4 FPDNA, CTC, ISTOLOGIA E CLINICA**

La valutazione dei livelli di FPDNA e della presenza di CTC nel contesto dei parametri clinici e istopatologici, ha fatto emergere alcune relazioni significative.

Per quanto concerne il DNA libero plasmatico, sebbene i valori misurati al prelievo basale non abbiano mostrato nessun ruolo prognostico/predittivo, i livelli di FPDNA al termine della terapia risultano associati alla risposta clinica al trattamento neoadiuvante ( $p=0,014$ , linear by linear association). Inoltre, confrontando la positività a tale marcatore al termine dei sei cicli di chemioterapia con la PFS e la OS, è stata osservata una correlazione tra alti livelli di FPDNA e progressione di malattia ( $p=0,01$  Fisher exact test). In particolare, 22 delle 24 pazienti (91.7%) con valori di FPDNA superiori al cut-off hanno mostrato una progressione di malattia o sono decedute, mentre 10 delle 26 pazienti (38.5%) con livelli inferiori al cut-off al termine della terapia, erano vive e libere da progressione/recidiva di malattia al momento dell'ultimo controllo. A conferma di quanto osservato, pazienti con livelli di FPDNA superiori e inferiori al cut-off al termine della

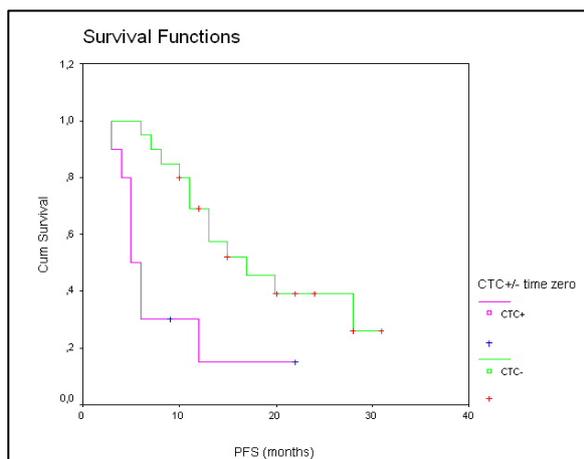
terapia mostrano curve Kaplan Meier di PFS significativamente separate ( $p=0,0019$ , Log rank test) (vedi figura 23).

Per quanto riguarda le CTC, invece, i risultati ottenuti con l'analisi da buffy coat sia prima che dopo la terapia, non hanno mostrato nessuna associazione con la sopravvivenza (PFS e OS). Al contrario, i dati ottenuti mediante arricchimento immunomagnetico, hanno evidenziato che la presenza di CTC al prelievo basale si associa ad un tempo medio di sopravvivenza libera da progressione di malattia più breve (7 vs 16 mesi, range 3-22 vs 6-31) e ad una minor sopravvivenza

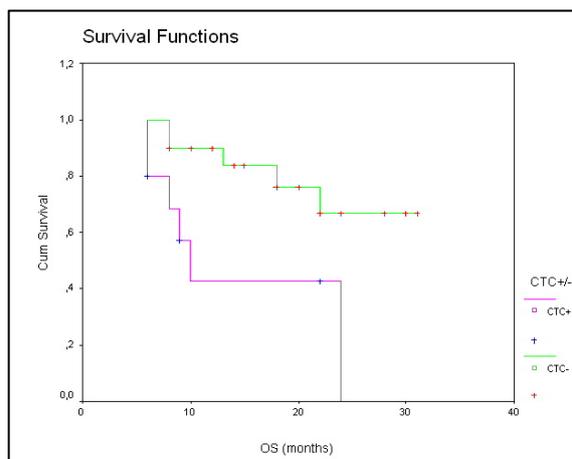


**Figura 23:** Curve di Kaplan Meier per la PFS in pazienti positive e negative per FPDNA dopo terapia neoadiuvante (Log rank test  $p=0,0019$ )

assoluta (media 12.2 vs 18.2 mesi, range 6-24 vs 8-31) ( $p= 0.004$  e  $p=0,04$ , rispettivamente). Pazienti positive e negative per le CTC al basale mostrano quindi curve di PFS e OS significativamente separate ( $p=0.0032$  e  $p=0.019$ , Log rank test).(figure 24 e 25)



**Figura 24:** Curve di Kaplan Meier per la PFS in pazienti positive e negative per CTC al basale (Log rank test  $p=0,0032$ )

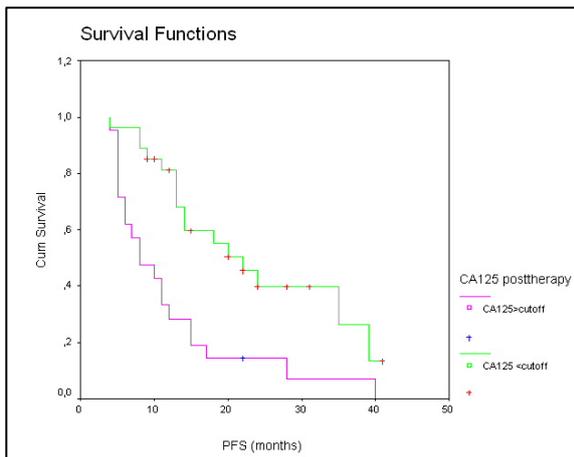


**Figura 25:** Curve di Kaplan Meier per la OS in pazienti positive e negative per CTC al basale (Log rank test  $p=0,019$ )

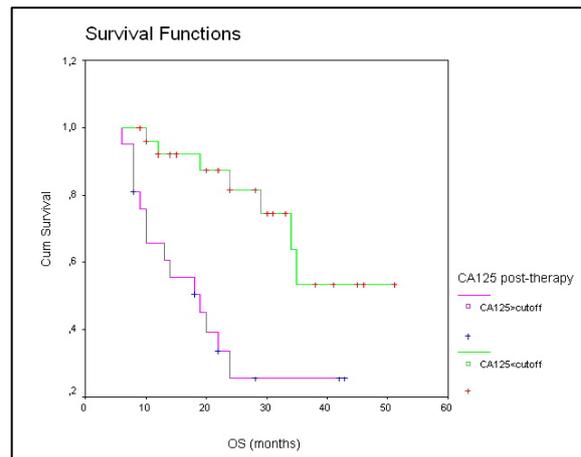
La presenza di CTC al basale è inoltre correlata alla risposta clinica alla terapia ( $p=0.028$ , linear by linear association) mentre non sono state evidenziate associazioni di alcun tipo tra la presenza di CTC al termine della terapia e la sopravvivenza.

I valori del marcatore sierico CA125 sono stati confrontati anch'essi con i dati di sopravvivenza. Nessuna associazione clinica è stata evidenziata con i livelli basali del marcatore, mentre valori superiori al cut-off al termine della terapia correlano sia con la progressione di malattia che con l'exitus. ( $p=0,006$  e  $p=0,008$ , Fisher exact test). In particolare, 20 delle 21 (95.2%) pazienti con

valori di CA125 sierico superiori al cut-off al termine della terapia, hanno mostrato una progressione di malattia e 14 (66.7%) di queste sono decedute. Per contro, delle 27 pazienti con valori inferiori al cut-off, 11 (40.7%) non hanno mostrato nessuna progressione e 20 (74%) erano vive al momento dell'ultimo controllo. Pazienti con valori di CA125 superiori e inferiori al cut-off mostrano curve di PFS e OS separate in modo statisticamente significativo. ( $p=0.0014$  e  $p<0,001$ , Log rank test) (figure 26 e27)



**Figura 26:** Curve di Kaplan Meier per la PFS in pazienti positive e negative per CA125 al termine della terapia (Log rank test  $p=0,0014$ )



**Figura 27:** Curve di Kaplan Meier per la OS in pazienti positive e negative per CA125 al termine della terapia (Log rank test  $p=0,0014$ )

## DISCUSSIONE

Il carcinoma della mammella e il carcinoma dell'ovaio rappresentano rispettivamente la prima e la nona neoplasia più frequente in ambito femminile nei paesi occidentali. L'identificazione precoce di ricorrenze locoregionali e a distanza è un fattore determinante per la sopravvivenza delle pazienti. Per questo motivo le pazienti sottoposte a intervento chirurgico o a terapia adiuvante/neoadiuvante necessitano di un follow-up con stretta sorveglianza per individuare precocemente ricorrenze asintomatiche.

I fattori prognostici e predittivi, a cui le Linee Guida Nazionali ed Internazionali fanno riferimento, sono oramai gli stessi da molti anni (stato dei linfonodi loco-regionali, recettori ormonali, età, dimensioni del tumore), ma non sempre sono sufficienti per identificare tempestivamente una recidiva neoplastica. E' quindi di grande attualità l'implementazione di nuovi test diagnostici, accurati, sensibili e poco invasivi da poter applicare con una frequenza regolare nel follow-up delle pazienti.

Metodiche molecolari quali la quantificazione del DNA libero plasmatico e l'individuazione di cellule tumorali circolanti nel sangue periferico, potrebbero rappresentare validi strumenti da affiancare alle attuali tecniche di *routine*.

In questo studio, tali indagini sono state applicate a tre diversi gruppi di pazienti (con carcinoma della mammella metastatico, con carcinoma della mammella precoce o localmente avanzato, e con carcinoma dell'ovaio avanzato) per valutare:

1. l'impatto della presenza di CTC e di alti livelli di DNA libero al momento del prelievo basale a scopo diagnostico e /o prognostico;
2. l'andamento dei marcatori CTC e DNA libero durante la chemioterapia neoadiuvante o adiuvante, per indagarne l'eventuale utilità nel predire la risposta al trattamento e la prognosi;
3. gli eventuali vantaggi di tali marcatori rispetto agli attuali marcatori sierici in uso nella clinica.

## **1 PAZIENTI CON CARCINOMA DELLA MAMMELLA METASTATICO**

Negli ultimi anni molti gruppi hanno indagato il ruolo di nuovi marcatori circolanti, tra cui FPDNA e CTC, nel contesto di pazienti con carcinoma della mammella metastatico. [21, 55,56]

Per quanto riguarda il DNA libero plasmatico, al momento dell'arruolamento nel nostro studio il 65% delle pazienti ha mostrato valori superiori al cut-off di normalità. La sensibilità diagnostica di questo marcatore appare in linea o leggermente inferiore a quella dei marcatori sierici CEA e CA15.3 già in uso nella routine clinica (75% e 65%, nel nostro studio), non supportando quindi l'utilità di un'eventuale introduzione delle valutazioni di FPDNA a scopo puramente diagnostico.

Dal confronto con i dati clinici di sopravvivenza, anche il possibile ruolo prognostico del FPDNA in questo gruppo di pazienti appare sminuito. Infatti, né la PFS né la OS appaiono significativamente differenti tra le pazienti che presentano alti livelli di DNA libero circolante al prelievo antecedente l'inizio terapia.

Merita invece di essere sottolineata l'associazione osservata tra l'andamento del FPDNA e la risposta clinica alla terapia. In particolare, 11 delle 12 pazienti non responsive al trattamento hanno mostrato livelli di FPDNA superiori al cut-off in tutti i prelievi analizzati mentre, nelle uniche due pazienti con risposta clinica parziale, il DNA libero si è mantenuto sempre stabile con valori inferiori al cut-off. Queste osservazioni portano quindi ad ipotizzare per questo marcatore un possibile ruolo nel monitoraggio della risposta alla terapia.

Risultati più incoraggianti sono stati ottenuti per le CTC. In ambito diagnostico, la sensibilità di questo biomarcatore appare fortemente influenzata dal metodo d'indagine utilizzato e, nel caso specifico dell'analisi dei trascritti mediante real time PCR, dai marcatori scelti. In genere, la sensibilità del marcatore CK19 risulta la più elevata tra i *markers* comunemente indagati nel carcinoma della mammella. [55,56] Anche nel nostro studio la sensibilità della CK19 è risultata superiore a quella di hMAM (75% vs 45%) anche se un po' più alta rispetto a quella mediamente ottenuta con altre metodologie (quali CellSearch e Adnatest).[57,58] Ma, in fondo, la maggior sensibilità della RT-PCR, che aumenta ulteriormente se si combinano i due marcatori (da 75 a 90%), è descritta anche in altri studi comparativi [56].

La scelta dei marcatori risulta cruciale anche per la determinazione del ruolo prognostico delle CTC. Infatti, mentre la positività al singolo marcatore CK19 (al momento della diagnosi) non risulta associata ad una peggior prognosi, la positività al singolo marcatore hMAM o ai due marcatori CK19 e hMAM si traduce in un minor tempo di sopravvivenza. L'associazione tra positività per le

CTC al prelievo basale e prognosi peggiore nelle pazienti con carcinoma della mammella metastatico ben rispecchia i risultati di altri importanti gruppi di ricerca. [21,28,57,60,61]

Entrando nel dettaglio dei *markers* da noi utilizzati, sicuramente hMAM si dimostra altamente specifico e quindi di grande validità per l'identificazione delle CTC; tuttavia, persiste il problema della sua espressione rilevabile solo in una minore percentuale di casi. Per contro, la Ck19 è invece più sensibile, e quindi estremamente utile come marcatore diagnostico di presenza di malattia minima residua, ma probabilmente per essere utilizzato come marcatore prognostico necessita di essere rivalutato con valori soglia maggiori. Infatti, se oltre alla valutazione della positività rispetto al valore soglia si considera anche il suo valore assoluto, si osserva come pazienti con valori di Ck19 molto elevati al prelievo basale abbiano poi avuto una prognosi infausta.. Andrebbero quindi effettuati studi più approfonditi per determinare il cut-off ottimale per tale marcatore.

D'altronde, la scelta del cut-off rappresenta un punto critico nella valutazione di queste metodiche. Ad esempio nei numerosi lavori di Cristofanilli et al [21,28,57], in cui è stato dimostrato il ruolo prognostico delle CTC nelle pazienti con carcinoma della mammella metastatico, diversi valori di cut-off (prima sperimentati in un gruppo di controllo) sono stati testati per la scelta di quello ottimale, individuato alla fine nella presenza di un numero  $\geq 5$  CTC/7.5 ml di sangue.

Comunque, oltre al suddetto ruolo prognostico, la valutazione delle CTC in corso di terapia offre la possibilità di monitorare in tempo reale, e in alcuni casi di predire, l'andamento clinico. Infatti, i valori di CK19 misurati nel prelievo corrispondente alla data di progressione o nelle date precedenti, sono risultati elevati, e quindi concordanti con l'andamento clinico, in 13/16 pazienti (81,3%) mentre quelli di hMAM erano elevati in 10/16 pazienti (62,5%). Se poi si considera la positività ad almeno uno dei due marcatori, un totale di 15/16 pazienti (93,75%) è identificabile con le CTC. Inoltre, va sottolineato che nella maggior parte di questi casi, anche dall'analisi dei prelievi antecedenti la progressione, in base agli alti livelli di marcatore riscontrati, era possibile predire l'andamento clinico. Queste osservazioni, unite al presupposto che nelle pazienti metastatiche la risposta alla terapia viene generalmente valutata soltanto attraverso analisi di imaging e determinazione dei marcatori sierici, per cui manca un riscontro effettivo della risposta ai farmaci su pezzo operatorio (analisi istologica del grado di regressione), supportano l'utilità di introdurre lo studio delle CTC per valutare l'andamento della malattia. E infatti, anche in un lavoro del gruppo di Cristofanilli viene proposta proprio l'identificazione delle CTC come tecnica superiore rispetto alle tecniche radiologiche di routine per la valutazione dello stato della malattia e della prognosi. [28]

## **2 PAZIENTI CON CARCINOMA DELLA MAMMELLA LOCALIZZATO O LOCALMENTE AVANZATO**

La quantificazione del DNA libero plasmatico in questo gruppo di pazienti ha mostrato il peggior risultato in termini di sensibilità del marcatore al momento della diagnosi (17.5%), ed i valori medi osservati non sono risultati essere significativamente diversi dai valori del gruppo di controllo. Tuttavia, per quanto poco sensibile, tale marcatore si associa al tempo di PFS: le pazienti con alti livelli di questo marcatore, infatti, hanno mostrato una significativa riduzione del tempo di sopravvivenza libera da progressione di malattia.

Al contrario, la determinazione di CTC ha mostrato risultati molto più interessanti.

Alla diagnosi, 17/40 (42.5%) pazienti sono risultate positive per la presenza di CTC, valutata mediante l'analisi di espressione dei trascritti di CK19 e hMAM da buffy coat. Anche in questo gruppo di pazienti il marcatore CK19 si è dimostrato molto più sensibile rispetto ad hMAM (17 pazienti positive vs 6). La presenza delle CTC non sembra quindi poter avere un ruolo diagnostico in questi stadi precoci; tuttavia, la correlazione evidenziata tra CTC e ridotta PFS, lascia ipotizzare un ruolo prognostico per questo marcatore.

Le informazioni più significative sono comunque emerse studiando l'andamento delle CTC durante e al termine della chemioterapia neoadiuvante. Infatti, pazienti positive per le CTC alla diagnosi ma diventate negative in corso di terapia, mostrano una miglior sopravvivenza sia rispetto alle pazienti sempre positive sia a coloro che hanno acquisito la positività a tale marcatore durante il trattamento. Quest'osservazione supporta quindi fortemente l'utilità di monitorare le CTC in corso di terapia anche negli stadi precoci di malattia, come già proposto per le pazienti con carcinoma della mammella metastatico.[28,59] Infine, la presenza di CTC al termine della terapia neoadiuvante risulta essere un importante parametro prognostico, in quanto correla con un minor tempo di sopravvivenza libera da progressione e con una minor sopravvivenza globale (OS).

Questi risultati, seppur emersi dallo studio di una casistica molto limitata, rispecchiano e confermano il ruolo prognostico delle CTC anche per le pazienti con carcinoma della mammella non metastatico, evidenziato di recente in importanti studi multicentrici effettuati su casistiche molto più ampie della nostra. [62,63]

Ricercando la stessa informatività per i due marcatori sierici in uso nella routine clinica, soltanto il CEA, valutato al termine della terapia, ha mostrato una correlazione con la sopravvivenza.

Nessuna correlazione è stata invece osservata tra la presenza delle CTC, prima o durante la terapia neoadiuvante, e la risposta patologica valutata sul pezzo operatorio post-terapia. Deve quindi essere abbandonata l'idea che questi marcatori possano fungere da marcatori predittivi di risposta

patologica, come evidenziato anche nei recenti studi multicentrici Remargus II e GeparQuattro [64,65]

Rispetto ai parametri clinici di stadiazione, la presenza di alti livelli di FPDNA e la positività per le CTC alla diagnosi, si associano entrambi alla dimensione della neoplasia e alla presenza di metastasi a distanza. Sebbene alcuni studi riportino invece una maggior incidenza delle CTC nelle pazienti con coinvolgimento linfonodale [66,67], la mancanza di tale correlazione osservata nel nostro e in altri studi [55], unita all'evidenza di una correlazione tra la presenza di CTC e metastasi a distanza, danno sostegno all'ipotesi dell'esistenza di due vie metastatiche distinte, quella ematica e quella linfatica. [3]

Molti studi hanno inoltre indagato le relazioni esistenti tra la presenza di CTC e le caratteristiche istopatologiche del tumore, mostrando correlazioni diverse (età, negatività per ER).[62,65] Nel nostro studio è stata evidenziata una correlazione tra la presenza di CTC e l'iperespressione/amplificazione del gene HER-2, associazione osservata anche da altro gruppo.[68] Infine, la correlazione osservata tra i due biomarcatori CTC e FPDNA al momento della diagnosi, potrebbe supportare l'ipotesi che parte del DNA libero circolante derivi dalla lisi di cellule tumorali circolanti [69]

### **3 PAZIENTI CON CARCINOMA DELL'OVAIO AVANZATO**

Anche nell'ambito della patologia ovarica, la ricerca scientifica è impegnata nell'individuazione di nuovi potenziali marcatori per la diagnosi precoce e per il monitoraggio della malattia neoplastica, allo scopo di poter intervenire efficacemente prima che questa raggiunga stadi troppo avanzati. I risultati incoraggianti ottenuti per il carcinoma della mammella e per altre neoplasie solide, hanno spinto molti gruppi a valutare il possibile ruolo prognostico/predittivo delle CTC e degli acidi nucleici circolanti nell'ambito del carcinoma ovarico. [70-75]

Nel nostro studio su 50 pazienti con carcinoma dell'ovaio in stadio avanzato (FIGO IIIc e IV), sono stati trovati risultati significativi soprattutto per il DNA circolante nel plasma. Innanzitutto la quantificazione del DNA libero presente plasma al momento della diagnosi si è dimostrata in grado di discriminare queste pazienti dai controlli sani, con una sensibilità del 76% e una specificità del 94%. Questo risultato appare in linea con quanto osservato in altri studi [50,76-78], sostenendo quindi il promettente ruolo diagnostico del FPDNA nel carcinoma ovarico.

Tuttavia, per quanto i risultati ottenuti siano indice di un buon test diagnostico, avendo analizzato in questo specifico caso stadi avanzati di neoplasia, anche il marcatore sierico CA125, attualmente utilizzato in clinica, risulta avere un'ottima sensibilità (98%). Quindi, per poter definire l'esatto

potenziale diagnostico del FPDNA appare di primaria importanza poter valutare i livelli di questo biomarcatore in ulteriori casistiche comprendenti anche stadi più precoci di malattia.

La valutazione del FPDNA durante l'intero iter di chemioterapia neoadiuvante ha mostrato una generale diminuzione dei livelli medi di FPDNA a partire dal primo ciclo, in accordo con quanto osservato in modelli ortotopici di carcinoma ovarico.[50] Nello specifico del nostro studio, la diminuzione della quantità di DNA libero plasmatico è avvenuta principalmente nelle pazienti che hanno mostrato una risposta parziale o completa al trattamento (20/32 pazienti), mentre in quelle pazienti che non hanno risposto in maniera ottimale alla chemioterapia neoadiuvante (stazionarietà) o che hanno avuto una progressione di malattia, i valori di DNA libero sono rimasti elevati e superiori al cut-off durante tutto il periodo del trattamento (12/18 pazienti). Di conseguenza, i dati di FPDNA rilevati al termine della terapia risultano associati in modo statisticamente significativo alla risposta clinica al trattamento neoadiuvante.

Ma soprattutto, la correlazione osservata tra la presenza di alti livelli di DNA libero al termine dei 6 cicli di chemioterapia ed un più breve tempo di sopravvivenza libera da progressione di malattia ( $p=0.0019$ ), fa emergere il DNA libero plasmatico come possibile marcatore prognostico. E proprio il ruolo prognostico di questo stesso marcatore è riportato in un altro studio pubblicato recentemente [75]. Tale correlazione è tuttavia stata evidenziata anche per il marcatore sierico CA125, che tra l'altro correla non soltanto con la progressione di malattia, bensì anche con la sopravvivenza globale ( $p=0.0014$  e  $p<0.001$ ). Alla luce di queste osservazioni, la possibilità di una concreta introduzione del test di quantificazione del DNA libero plasmatico nella pratica clinica come singolo fattore prognostico appare un po' ridotta, anche se rimane supportata dai migliori risultati ottenuti in altri studi [75].

D'altronde, la mera quantificazione del FPDNA presenta altri importanti limiti di specificità, come ad esempio il brusco aumento di valori osservato in seguito all'intervento chirurgico. Infatti, in tutte le pazienti operate, i livelli di FPDNA misurati nel prelievo effettuato 24 ore dopo l'intervento e in quello effettuato a distanza di 10 giorni, erano significativamente aumentati e decisamente al di sopra del cut-off, e solo a distanza di un mese si sono riportati ai livelli pre-intervento. Questo fenomeno è una diretta conseguenza dell'invasività dell'operazione chirurgica durante la quale il rilascio in circolo di alti livelli di DNA, provenienti non solo dalle cellule neoplastiche bensì anche da cellule normali, è inevitabile, e comunque in accordo con quanto dimostrato in studi su modelli murini.[51] Infine, non va dimenticato che alti livelli di DNA libero circolante possono essere riscontrati anche in condizioni fisiologiche non tumorali, quali malattie autoimmuni, traumi o appunto procedure chirurgiche. [43]

Per quanto riguarda le CTC, le analisi effettuate da buffy coat utilizzando solo il marcatore CK7, hanno evidenziato che questo metodo di indagine risulta poco sensibile e poco specifico per la corretta quantificazione dei trascritti derivanti dalle cellule tumorali circolanti in questa patologia, verosimilmente per la presenza dei cosiddetti “trascritti illegittimi” di origine linfocitaria. Inoltre, in base ai risultati ottenuti con questa metodica non è emersa nessuna relazione tra concentrazione del marcatore e andamento della malattia.

Al contrario la tecnica di arricchimento immunomagnetico, permettendo di selezionare specificatamente le cellule esprimenti l'antigene BerEP4 (cioè di origine epiteliale), sembra aumentare la sensibilità e la specificità dell'analisi di identificazione delle CTC. Grazie a questa procedura, è infatti stato possibile analizzare oltre alla CK7 anche i marcatori MUC1, hTERT, EGFR, HER2 e CA125, permettendo di caratterizzare in modo più completo le CTC dal punto di vista molecolare. Ne è emerso un profilo d'espressione molto variabile tra una paziente e l'altra, mentre i marcatori più sensibili sono risultati essere CK7, MUC1 ed hTERT.

Il numero di pazienti positive per le CTC alla diagnosi (33.3%) appare in linea o leggermente superiore a quanto riportato in altri studi [72,79], così come la riduzione della positività a tale marcatore osservata al termine della chemioterapia neoadiuvante [72]

Sicuramente degno di nota è il fatto che la presenza di CTC al prelievo basale risulti associata alla risposta clinica alla terapia, ad un minor tempo di sopravvivenza libera da progressione di malattia e alla sopravvivenza globale. Sebbene riferiti a un piccolo gruppo di pazienti (30) questi dati sostengono quindi l'ipotesi che le CTC possano avere un significato prognostico anche per le pazienti con carcinoma ovarico, per il quale sono attualmente riportate in letteratura informazioni molto contrastanti.[70,72-74,79] Comunque, al di là del ruolo prognostico o meno, la presenza di CTC nel sangue periferico di queste pazienti, testimonia l'esistenza di una via di disseminazione ematica anche per il carcinoma ovarico, che non deve quindi essere considerato una patologia confinata solo alla cavità addominale. [71, 80]

## **CONSIDERAZIONI METODOLOGICHE**

### **ISOLAMENTO DELLE CTC**

L'utilizzo delle tecniche di arricchimento immunomagnetico in cellule di origine epiteliale permette di eliminare la maggior parte dei linfociti presenti nel buffy coat; eliminando in tal modo la maggior fonte di trascritto illegittimo dei marcatori scelti. Questo rende possibile l'analisi di un maggior numero di marcatori che, appunto per l'elevato livello di trascritto illegittimo, risulterebbero altrimenti sovrastimati. È questo il caso dei marcatori MUC-1, Her-2, EGFR, Ck7, Ck19, CA125 ed

hTERT da noi scelti per la valutazione delle CTC nelle neoplasie oggetto di studio. Il poter disporre di un maggior numero di marcatori può essere utile per identificare e caratterizzare al meglio i carcinomi delle diverse pazienti con profili eterogenei di espressione.

Nel nostro studio, l'impiego delle due metodiche ha condotto a risultati un po' differenti in funzione dei diversi gruppi di pazienti.

- Nelle pazienti con carcinoma della mammella metastatico, i marcatori Ck19 ed hMAM hanno avuto sostanzialmente lo stesso andamento. In tre casi, tuttavia, l'arricchimento ha portato ad una positività per Ck19 non osservata da buffy coat. Tale aumento di sensibilità è ascrivibile, oltre che alla già citata eliminazione dei linfociti, al volume di campione utilizzato. Infatti, nella procedura di arricchimento magnetico vengono analizzate in un'unica reazione di PCR tutte le cellule neoplastiche presenti in 4 ml di sangue, diversamente da quanto avviene per l'analisi da buffy coat, dove solo un microgrammo di RNA totale viene analizzato (corrispondente a circa 1/10 del volume di tutto il campione). L'aver arricchito il campione in cellule tumorali ha, quindi, contribuito ad evidenziare la presenza anche di poche cellule tumorali. Per quanto riguarda hMAM, invece, è stato osservato un 100% di concordanza tra i due metodi di analisi.

Tra gli altri marcatori analizzati, la CK7 e MUC-1, mostrando un'espressione solo nei casi già positivi per Ck19 e/o hMAM, possono essere utilizzati per una conferma della positività, ma non contribuiscono ad aumentare la sensibilità diagnostica, così come Her-2 ed EGFR. Tuttavia la ricerca di questi ultimi due marcatori può rappresentare un'utile informazione per l'indicazione della terapia, in quanto non per tutte le pazienti è sempre possibile reperire materiale per effettuare una caratterizzazione istologica e biomolecolare.

- Nelle pazienti con carcinoma della mammella localizzato i risultati ottenuti con le due metodiche sono stati fortemente discordanti, e la metodica più sensibile è risultata essere quella senza arricchimento. Come spiegato in precedenza, probabilmente la causa è da ricercarsi: 1) nell'esiguo numero di CTC presenti in questo gruppo rispetto alle pazienti con neoplasie metastatiche, per cui analizzando provette di sangue diverse risulta meno probabile ottenere risultati simili; 2) in una possibile downregulation di molecole epiteliali, tra cui l'antigene BerEp4, verosimilmente legata al processo noto come *Epithelial to Mesenchymal Transition*, che consente alle cellule epiteliali di entrare nel circolo sanguigno. Comunque, anche in questo gruppo di pazienti la CK19 è risultata essere un marcatore più sensibile rispetto ad hMAM.
- Nelle pazienti con carcinoma ovarico, i dati ottenuti con una metodica raramente coincidono con quelli ottenuti con l'altra. D'altronde, la totale mancanza di marcatori idonei per

l'analisi da buffy coat ci ha spinto a provare lo stesso ad utilizzare la CK7 come singolo marcatore, nonostante il suo range d'espressione alquanto variabile nei soggetti di controllo. Purtroppo, visti gli scarsi risultati ottenuti, è chiaro come la procedura di selezione positiva mediante arricchimento immunomagnetico sia risultata automaticamente essere la più idonea per l'identificazione delle CTC in questo gruppo di pazienti. Riguardo ai marcatori scelti, CK7, MUC-1 e hTERT sono risultati i più sensibili, mentre HER2 ed EGFR potrebbero eventualmente essere impiegati solo per una caratterizzazione a scopo terapeutico.

#### QUANTIFICAZIONE DEL DNA LIBERO PLASMATICO

Come ricordato in precedenza, alti livelli di DNA libero circolante, oltre che in pazienti con neoplasie solide di vario tipo [37,46,81] possono essere riscontrati anche in condizioni fisiologiche non tumorali, quali malattie autoimmuni, traumi o procedure chirurgiche.[41]

Per superare questo ostacolo e confermare l'origine neoplastica del DNA ritrovato, sarebbe necessaria una caratterizzazione basata su mutazioni tumore-specifiche o alterazioni epigenetiche, analisi che sono state effettuate con successo in studi relativi a diversi tumori umani [43,44,46,81,82] Sfortunatamente, però, né per il carcinoma della mammella né per quello dell'ovaio, sono state individuate, ad oggi, singole mutazioni/alterazioni sufficientemente specifiche e sensibili da poter essere applicate facilmente nella routine clinica oncologica. L'unica strada percorribile sembra quindi essere quella di ricercare non una sola, ma un pannello di alterazioni genetiche ed epigenetiche. [84-86]

Nel nostro gruppo abbiamo provato a caratterizzare il DNA libero plasmatico utilizzando la metodica MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) e il kit SALSA MLPA KIT P105-C1 Oligodendroglioma-2 (MRC-Holland), che permette di valutare contemporaneamente fino a 45 geni target diversi in un'unica reazione. Purtroppo, in fase di ottimizzazione della metodica, è emerso un problema di sensibilità: infatti, la quantità minima di DNA correttamente amplificabile dal suddetto kit è risultata essere 50 ng (concentrazione 10 ng/μl), quantità non disponibile nei campioni della maggior parte delle pazienti in studio. E' stata quindi tentata la strategia di una reazione di pre-amplificazione di tutto il DNA genomico estratto (*Whole Genome Amplification*), ma non è stato comunque possibile ottenere risultati soddisfacenti (dati non riportati). Resta quindi ancora aperta l'individuazione del metodo più idoneo per poter caratterizzare il DNA libero plasmatico nella pratica clinica.



## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel nostro studio, sebbene relativi ad una casistica molto limitata, supportano l'utilità della valutazione di CTC e FPDNA in pazienti oncologici con tumori solidi a diverso stadio, sia in campo prognostico che terapeutico.

In particolare, per le pazienti affette da carcinoma della mammella metastatico, l'identificazione delle CTC si conferma essere un marcatore prognostico di sopravvivenza, oltre che un marcatore utile per monitorare l'andamento clinico della malattia in tempo reale. Anche nelle pazienti con carcinoma in stadio precoce o localmente avanzato, la presenza di CTC al momento della diagnosi, ed ancor più al termine del trattamento neoadiuvante, si dimostra in grado di predire la sopravvivenza e la progressione di malattia. Queste osservazioni, in perfetto accordo con quanto osservato da altri gruppi, supportano la teoria che il carcinoma della mammella debba essere considerata una malattia sistemica fin dai primi stadi di malattia.

Anche nel carcinoma dell'ovaio la presenza di CTC si è rivelata essere un marcatore prognostico di sopravvivenza; tuttavia, a causa della necessità di utilizzare una metodica più costosa, sia in termini economici che di tempo (arricchimento immunomagnetico e analisi di un ampio pannello di marcatori), per l'identificazione di tali cellule, la sua introduzione nella routine clinica appare di più difficile attuazione. Al contrario, la quantificazione del DNA libero plasmatico, sembra essere un test molto promettente, non invasivo e poco costoso, per il monitoraggio della risposta alla terapia e la valutazione della progressione di malattia, nelle pazienti con carcinoma ovarico in stadio avanzato. Tale determinazione potrebbe quindi affiancare la valutazione del marcatore sierico CA125, da molti considerato poco sensibile e poco specifico, nella pratica clinica, al fine di ottenere informazioni più accurate per le singole pazienti.

Le osservazioni emerse in questo studio dovranno essere confermate e rivalutate mediante analisi statistica multivariata, ma tuttavia appaiono promettenti ed in linea con quanto riportato dai più importanti gruppi di ricerca operanti nel campo dei marcatori molecolari circolanti, e testimoniano, allo stesso tempo, la qualità della metodica di real time PCR da noi utilizzata per la valutazione dei suddetti marcatori.



## BIBLIOGRAFIA

- [1] Fidler IJ. Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nature New Biol.* 1973;242:148-149.
- [2] Weiss L, Holmes JC, Ward PM. Do metastases arise from pre-existing subpopulation of cancer cells? *Br J Cancer* 1983;47:81-88.
- [3] Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nature Cancer reviews* 2004;4:448-455
- [4] Braun S, Pantel K, Müller P, et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med.* 2000;342(8):525-33.
- [5] Bernards R, Weinberg RA. A progression puzzle. *Nature* 2002;418(6900):823-24
- [6] Wölfle U, et al. Molecular signature associated with micrometastasis in human breast cancer *Cancer Research* 2003,63:5679-5684.
- [7] Van't Veer LJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-536.
- [8] Paterlini-Brechot P, Benali NL. Cg tumor cells (CTC detection: clinical impact and future directions. *Cancer Letters* 2007;253:180-204
- [9] Engell HC. Cancer cells in the circulating blood. *Acta Chir Scand (Suppl):* 201,1955
- [10] Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol.* 1998 Sep;153(3):865-73.
- [11] Ghossein RA, Bhattacharya S.: Molecular detection and characterization of circulating tumor cells and micrometastases in prostatic, urothelial, and renal cell carcinomas. *Semin Surg Oncol.* 2001;20(4):304-11.
- [12] Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(5):329-40.
- [13] Schardt JA, Meyer M, Hartmann CH, et al. Genomic analysis of single cytokeratin-positive cells from bone marrow reveals early mutational events in breast cancer. *Cancer Cell.* 2005;8(3):227-39.
- [14] Gangnus R, Langer S, Breit E, et al. Genomic profiling of viable and proliferative micrometastatic cells from early-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004;10(10):3457-64.
- [15] Hoffmann AC, Warnecke-Eberz U, Luebke T, et al. Survivin mRNA in peripheral blood is frequently detected and significantly decreased following resection of gastrointestinal cancers. *J Surg Oncol.* 2007;95(1):51-4.

- [16] Solakoglu O. et al. Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 2002; 99:2246-225.
- [17] Méhes G, Witt A, Kubista E, Ambros PF. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol.* 2001;159(1):17-20.
- [18] Slade MJ, Coombes, RC. The clinical significance of disseminated tumor cells in breast cancer. *Nature Clin Practice Onc.* 2007;4:30-41.
- [19] Müller V, Stahmann N, Riethdorf S, et al. Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res.* 2005;11(10):3678-85.
- [20] Wiedswang G, Borgen E, Schirmer C, et al. Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *Int J Cancer.* 2006;118(8):2013-9.
- [21] Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:781-791.
- [22] Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3213–3221.
- [23] 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;14:6302–6309.
- [24] Harris L et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:5287-5312.
- [25] Ring A, Smith IE, Dowsett M. Circulating tumor cells in breast cancer. *Lancet* 2004;5:79-90.
- [26] Alix-Panabieres C, Riethdorf S, Pantel K. Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin Cancer res* 2008;14(16):5013-5020
- [27] Allan AL, Keeney M. Circulating tuor cll analysis:technical and statistical considerations for application to the clinic. *J Oncol.* 2010;2010:426218
- [28] 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(14):4218-4224.
- [29] Wiedswang et al. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol*2003;18:3469-3478
- [30] Jiang WG, Martin TA, Mansel RE. Molecular detection of micro-metastasis in breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2002;43:13-31.
- [31] Reinholz MM, Nibbe A, Jonart LM, et al. Evaluation of a panel of tumor markers for molecular detection of circulating cancer cells in women with suspected breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(10):3722-3732.

- [32] Gargano G, Agnese V, Calò V, et al. Detection and quantification of mammaglobin in the blood of breast cancer patients: can it be useful as a potential clinical marker? Preliminary results of a GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale) a prospective study. *Ann Onc* 2006;17:41-45.
- [33] Mercatali L, Valenti V, Calistri D, et al. RT-PCR determination of maspin and mammaglobin B in peripheral blood of healthy donors and breast cancer patients. *Ann Oncol* 2005;17:424-428.
- [34] Shen C, Hu L, Xia L, Li Y. The detection of circulating tumor cells of breast cancer patients by using multimarker (Survivin, hTERT and hMAM) quantitative real-time PCR. *Clin Biochem.* 2009;42(3):194-200.
- [35] Anker P. Quantitative aspects of plasma/serum DNA in cancer patients *Ann NY Acad.Sci* 2000;906:5-7.
- [36] Tong YK, Lo YMD. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clin Chim Acta* 2006;363:187-196.
- [37] Silva JM, Dominguez G, Garcia JM, et al. Presence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations. *Cancer Research* 1999;59:3251-3256.
- [38] Vlassov VV., Laktionov PP., and Rykova EY. Extracellular Nucleic Acids. *Bio Essay* 2007;29:654-667
- [39] Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.*1977; 37:646-650.
- [40] Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, et al. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* 313: 139-142.
- [41] Holdenrieder, Stieber, Bodenmüller, et al. Circulating nucleosome in serum. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2001;945:93-102.
- [42] Sorenson GD, Porter DM, Barth RJ, et al. Detection of mutated KRAS2 sequences in plasma from patients with pancreatic carcinoma in comparison with the Ca19-9 assay. *J. Int. Soc. Oncodev. Biol. Med.* 1997;18:66.
- [43] Chen X., Bennefoid H., Diebold-Berger S. et al. Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clin. Cancer Res.*1999;5:2297-2303
- [44] Diehl F, Li M, Dressman D, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:16368-16373.
- [45] Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantifications and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001;61:1659-1665.
- [46] Altimari A, Grigioni AD, Benedettini E, et al. Diagnostic role of circulating free plasma DNA detection in patients with localized prostate cancer. *Am J Clin Pathol* 2008;129(5):756-62.

- [47] Holdenrieder and Stieber. Therapy control in oncology by circulating nucleosomes. *Ann. N. y. Acad. Sci.* 1022:211-216 (2004).
- [48] Wu TL., Zhang D., Chia JH., et al. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin Chim Acta.* 2002 Jul; 321 (1-2): 77-87
- [49] Papadopoulou E, Davilas E, Stiriou V, et al. Cell-free DNA and RNA in plasma as a new molecular marker for prostate and breast cancer. *Ann. NY Acad Sci* 2006;1075:235-243.
- [50] Kamat AA., Sood AK., Dang D, et al. Quantification of total plasma cell-free DNA in ovarian cancer using real-time PCR. *Ann NY Acad Sci.* 2006 Sep; 1075: 230-4
- [51] Rago C., Huso DL, Diehl F, et al. Serial assessment of human tumor burdens in mice by the analysis of circulating DNA *Cancer Res* 2007;67(19): 9364-70.
- [52] Perkins GL, Slater ED, Sanders GK, et al. Serum tumor markers. *American Family Physician* 2003;68(6):1075-1082.
- [53] Bast RC Jr, Badgwell D, Lu Z, et al. New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer.* 2005;15(suppl 3):274-281.
- [54] Ogston KN, Miller ID, Payne S, et al. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *The Breast* 2003; 12(5):320-27.
- [55] Reinholz MM, Kitzmann KA, Tenner K, et al. Cytokeratin-19 and Mammaglobin Gene Expression in Circulating Tumor Cells from Metastatic Breast Cancer Patients Enrolled in North Central Cancer Treatment Group Trials, N0234/336/436/437. *Clin Cancer Res* 2011; 17(22):7183-93
- [56] Van der Auwera I, Peeters D, Benoy IH, et al. Circulating tumor cell detection: a direct comparison between the CellSearch System, the AdnaTest and CK-19/mammaglobin RT-PCR in patients with metastatic breast cancer. *Br J Cancer* (2010) 102, 276-284
- [57] Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, et al. *Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer.* *J Clin Oncol* 2005;23:1420-1430.
- [58] Tewes M, Aktas B, Welt A, et al. Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Jun;115(3):581-90.
- [59] Pierga JY, Hajage D, Bachelot T, et al. High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients. *Ann Oncol* 2011
- [60] Liu MC, Shields PG, Warren RD, et al. Circulating tumor cells: a useful predictor of treatment efficacy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(31):5153-9.
- [61] Nolé F, Munzone E, Zorzino L, et al. Variation of circulating tumor cell levels during treatment of metastatic breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Ann Oncol.* 2008;19(5):891-7.

- [62] Bidard FC, Mathiot C, Delalogue S, et al. Single circulating tumor cell detection and overall survival in nonmetastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2010 ;21(4):729-33.
- [63] Xenidis N, Ignatiadis M, Apostolaki S, et al. Cytokeratin-19 mRNA-positive circulating tumor cells after adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(13):2177-84.
- [64] Pierga JY, Bidard FC, Mathiot C, et al. Circulating tumor cell detection predicts early metastatic relapse after neoadjuvant chemotherapy in large operable and locally advanced breast cancer in a phase II randomized trial. *ClinCancerRes* 2008;14(21):7004-7010
- [65] Riethdorf S, Müller V, Zhang L, et al. Detection and HER2 expression of circulating tumor cells: prospective monitoring in breast cancer patients treated in the neoadjuvant GeparQuattro trial. *Clin Cancer Res.* 2010;16(9):2634-45.
- [66] Giribaldi G, Procida S, Ulliers D, et al. Specific detection of cytokeratin 20-positive cells in blood of colorectal and breast cancer patients by a high sensitivity real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction method. *J Mol Diagn.* 2006;8(1):105-12.
- [67] Kahn HJ, Presta A, Yang LY, et al. Enumeration of circulating tumor cells in the blood of breast cancer patients after filtration enrichment: correlation with disease stage. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;86(3):237-47.
- [68] Lang JE, Mosalpuria K, Cristofanilli M, et al. HER2 status predicts the presence of circulating tumor cells in patients with operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;113(3):501-7.
- [69] Schwarzenbach H, Alix-Panabieres C, Muller I, et al. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15(3):1032–8.
- [70] Fan T, Zhao Q, Chen JJ, et al. Clinical significance of circulating tumor cells detected by an invasion assay in peripheral blood of patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2009;112: 185-191
- [71] Braun S, Schindlbeck C, Hepp F, et al. Occult Tumor Cells in Bone Marrow of Patients With Locoregionally Restricted Ovarian Cancer Predict Early Distant Metastatic Relapse. *J Clin Oncol* 2001;19(2):368-375
- [72] Wimberger P, Heubner M, Otterbach F, et al. Influence of platinum-based chemotherapy on disseminated tumor cells in blood and bone marrow of patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2007;107:331-338
- [73] Fehm T, Becker S, Bachmann C, et al. Detection of disseminated tumor cells in patients with gynaecological cancer. *Gynecol Oncol* 2006;103:942-947
- [74] Marth C, Kisic J, Kaern J, et al. Circulating Tumor Cells in the Peripheral Blood and Bone Marrow of Patients with Ovarian Carcinoma Do Not Predict Prognosis. *Cancer* 2002; 94: 707-12
- [75] Kamat AA, Baldwin M, Urbauer D, et al. Plasma cell-free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker. *Cancer.* 2010;116(8):1918-25.

- [76] Kamat AA, Bischoff FZ, Dang D, et al. Circulating cell-free DNA: a novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2006;5:1369–1374.
- [77] Swisher EM, Wiollan M, Mahtani SM, et al. Tumor-specific p53 sequences in blood and peritoneal fluid from women with epithelial ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194:1702–1709.
- [78] Meyer T, Rustin GJ. Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer.* 2000;82:1535–1538.
- [79] Judson PL, Geller MA, Bliss RL, et al. Preoperative detection of peripherally circulating cancer cells and its prognostic significance in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003;1:389-394
- [80] Cormio G, Rossi C, Cazzolla A, et al. Distant metastases in ovarian carcinoma. *Int. J. Gynecol Cancer* 2003;13:125-129
- [81] Sozzi G, Conte D, Leon M, et al. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21:3902–3908.
- [82] Muller I, Urban K, Pantel K, et al. Comparison of genetic alterations detected in circulating microsatellite DNA in blood plasma samples of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:222–9.
- [83] Schwarzenbach H, Chun FK, Muller I, et al. Microsatellite analysis of allelic imbalance in tumour and blood from patients with prostate cancer. *BJU Int* 2008;102(2):253–8.
- [84] Matuschek C, Bölke E, Lammering G, et al. Methylated APC and GSTP1 Genes in Serum DNA Correlate with the Presence of Circulating Blood Tumor Cells and are Associated with a More Aggressive and Advanced Breast Cancer Disease. *Eur J Med Res.* 2010;15(7):277-86
- [85] Van der Auwera I, Elst HJ, Van Laere SJ et al. The presence of circulating total DNA and methylated genes is associated with circulating tumour cells in blood from breast cancer patients. *Br J Cancer.* 2009;100(8):1277-86.
- [86] Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(6):426-37.

## LAVORI PRODOTTI DURANTE IL PERIODO DI DOTTORATO

1. Zamagni C, Wirtz RM, De Iaco P, Rosati M, Veltrup E, Rosati F, **Capizzi E**, Cacciari N, Alboni C, Bernardi A, Massari F, Quercia S, D'Errico Grigioni A, Dietel M, Sehouli J, Denkert C, Martoni AA. Oestrogen receptor 1 mRNA is a prognostic factor in ovarian cancer patients treated with neo-adjuvant chemotherapy: determination by array and kinetic PCR in fresh tissue biopsies. *Endocr Relat Cancer*. 2009 Dec;16(4):1241-9.
2. Gruppioni E, Vasuri F, Fiorentino M, **Capizzi E**, Altimari A, Pirini MG, Grazi GL, Malvi D, Grigioni WF, D'Errico-Grigioni A. Real-time quantitative assay for routine testing of HCV RNA in formalin-fixed, paraffin-embedded liver samples. *Diagn Mol Pathol*. 2009 Dec;18(4):232-8.
3. Fiorentino M, **Capizzi E**, Loda M. Blood and tissue biomarkers in prostate cancer: state of the art. *Urol Clin North Am*. 2010 Feb;37(1):131-41,
4. Vasuri F, **Capizzi E**, Bellavista E, Mishto M, Santoro A, Fiorentino M, Capri M, Cescon M, Grazi GL, Grigioni WF, D'Errico-Grigioni A, Franceschi C. Studies on immunoproteasome in human liver. Part I: absence in fetuses, presence in normal subjects, and increased levels in chronic active hepatitis and cirrhosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jun 25;397(2):301-6.
5. Vasuri F, Golfieri R, Fiorentino M, **Capizzi E**, Renzulli M, Pinna AD, Grigioni WF, D'Errico-Grigioni A. OATP 1B1/1B3 expression in hepatocellular carcinomas treated with orthotopic liver transplantation. *Virchows Arch*. 2011 Aug;459(2):141-6. Epub 2011 Jun 21.

