

# Lavori originali

## DNA LIBERO CIRCOLANTE NEL PLASMA COME BIOMARCATORE ED INDICATORE PROGNOSTICO NEL CANCRO DEL POLMONE

### FREE PLASMATIC CIRCULATING DNA AS PROGNOSTIC AND DIAGNOSTIC BIOMARKER IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER

M. PACI\*, S. MARAMOTTI\*\*\*\*, E. BELLESIA\*\*\*\*, D. FORMISANO\*\*\*\*\*, L. ALBERTAZZI\*\*\*\*, T. RICCHETTI\*,  
C. CARBONELLI\*\*, G. FERRARI\*, V. ANNESSI\*, S. DE FRANCO\*\*\*, C. VECCHI\*\*\*\*, D. LASAGNI\*\*\*\*\*,  
G. BAGLIONI\*\*\*\*\*, R. BARICCHI\*\*\*\*\*, G. CASTELLINI\*\*\*\*, L. ZUCCHI\*\*, M. BRINI\*\*\*\*, G. SGARBI\*

\*Struttura Complessa di Chirurgia Toracica - \*\*Struttura Complessa di Pneumologia -

\*\*\*Struttura Complessa Servizio di Formazione, Innovazione Clinica e Biblioteca - \*\*\*\*Laboratorio Chimico-Clinico -

\*\*\*\*\*Laboratorio di Immunoematologia e Trasfusionale - \*\*\*\*\*Ufficio Epidemiologia e Statistica-Direzione Sanitaria -  
Arcispedale S. Maria Nuova, Reggio Emilia

#### RIASSUNTO

*Introduzione:* La presenza di DNA circolante, nel plasma di persone affette da neoplasie maligne, è un dato noto da circa 30 anni. Da allora sono state investigate sia la concentrazione del DNA libero circolante plasmatico che le alterazioni genetiche ed epigenetiche del DNA tumorale di pazienti affetti da diversi tipi di tumore. L'analisi del DNA circolante nel plasma può risultare un utile marcatore per l'anticipazione diagnostica delle neoplasie maligne. Questo studio è stato disegnato per validare la quantificazione del DNA circolante come test in grado di identificare precocemente pazienti con cancro del polmone, seguire l'evoluzione della malattia e definire la sensibilità e specificità di tale metodo.

*Materiali e Metodi:* La quantità di DNA plasmatico è stata determinata attraverso l'utilizzo della PCR real-time quantitativa con l'amplificazione del gene human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in 154 pazienti affetti da cancro polmonare ed in 79 controlli sani. La performance del test è stata valutata tramite la curva ROC. L'associazione tra concentrazioni di DNA e le principali variabili demografiche, cliniche e patologiche è stata esaminata con modelli di regressione logistica e lineare multipla.

*Risultati:* La concentrazione di DNA circolante plasmatico è risultata circa quattro volte superiore nei pazienti rispetto ai controlli (12,8 vs 2,9 ng/ml). L'area sotto la

curva (ROC) è risultata 0,79 (95%IC, 0,710-0,83). La concentrazione di DNA libero circolante si è dimostrato un importante fattore di rischio di presenza di malattia ed un indice prognostico nel follow-up.

*Conclusioni:* Lo studio ha evidenziato che tramite la PCR quantitativa si possono riscontrare valori di DNA circolante più elevati nei pazienti affetti da neoplasia polmonare rispetto ai controlli sani. Questo potrebbe avere implicazioni pratiche quali la possibilità di essere utilizzato in programmi di screening e di avere una rilevanza prognostica nel follow-up.

#### Parole chiave

DNA libero circolante, Cancro del polmone, Carcinogenesi, Prognosi, Diagnosi Precoce, Marcatore Biologico, PCR

#### SUMMARY

*Introduction:* The presence of tumor DNA in cell free DNA circulating in the plasma of cancer patients was first demonstrated 30 years ago. Since then, overall plasma DNA concentration in cancer patients and genetic or epigenetic alterations specific to tumor DNA have been investigated in patients diagnosed with different types of cancer. Analysis of circulating DNA in plasma can provide a useful marker for earlier cancer detection. This study was designed to validate the methodology utilized

to assess the sensitivity and specificity of a quantitative molecular assay of circulating DNA to identify patients with lung cancer and follow-up the disease.

**Materials and Methods:** The amount of plasma DNA was determined through the use of real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) amplification of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) in 154 non-small-cell lung cancer patients and 79 controls. Screening performance of the assay was calculated through the receiver operating characteristic (ROC) curve. Odds ratios were calculated using logistic regression analysis.

**Results:** Median concentration of circulating plasma DNA in patients was almost four times the value detected in controls (12.8 v 2.9 ng/ml). The area under the ROC curve was 0.79 (95%CI, 0.710-0.83). Plasma DNA was a strong risk factor for lung cancer, and higher value were associated to worst prognosis in follow-up.

**Conclusion:** This study shows that higher levels of free circulating DNA can be detected in patients with lung cancer compared with disease-free controls by PCR assay. The implication is that high levels of plasma DNA could identify higher-risk individuals for lung cancer screening and could have a prognostic relevance during follow-up.

### Key words

Circulating free DNA, Lung Cancer, Carcinogenesis, Prognosis, Early Diagnosis, Biomarker, PCR

## INTRODUZIONE

Il cancro del polmone rappresenta il maggior killer oncologico essendo responsabile ogni anno di un numero di morti superiore al cancro del colon, della mammella e della prostata insieme. In Italia vengono diagnosticati 35.000 nuovi casi l'anno, 150.000 in Europa, circa 1.000.000 nel mondo, di questi non più del 10% possono essere trattati chirurgicamente con finalità curative, per l'assenza di piani di diagnosi precoce e l'alta frequenza di metastasi alla diagnosi (1). Infatti soltanto il 15% dei pazienti presenta una forma localizzata in stadio I e II. Il 30% dei pazienti alla diagnosi ha un interessamento linfonodale regionale ed oltre il 55% una diffusione metastatica a distanza (2). Degli operati circa la metà muore entro 5 anni, nonostante venga eseguito un intervento di exeresi potenzialmente curativo.

Nonostante nuove e moderne metodiche terapeutiche la sopravvivenza a 5 anni dei pazienti non supera il 14% (3).

I tassi di mortalità rispecchiano quelli di incidenza. L'incidenza aumenta con l'età ed il picco si registra tra i 55 ed i 65 anni, oltre 1/3 dei nuovi casi è diagnosticato in pazienti con più di 70 anni. I tassi di incidenza e mortalità corretti per l'età mostrano un costante decremento nei maschi ed un incremento nelle donne. Nell'uomo la mortalità per cancro del polmone è scesa negli ultimi anni, in controtendenza invece, a partire dal 1987 l'incremento dei decessi per tumore polmonare nella donna che ha registrato un incremento del 15% nelle ultime decadi e risulta attualmente la terza causa di morte per neoplasia dopo mammella ed intestino.

Lo sviluppo del tumore polmonare è il risultato dell'accumulo di anomalie genetiche multiple (10-20) e sequenziali per esposizione a fattori mutageni ambientali (fumo di sigaretta, radon, inquinamento ambientale, esposizioni professionali come asbesto, cromo, arsenico, idrocarburi aromatici, clorometilene e berillio) o per anomalie genetiche trasmesse ereditariamente, a questo proposito è stata osservata un'aumentata incidenza nei familiari dei malati con anomalie cromosomiche specifiche (1).

Un ruolo importante sembrano rivestire anche le patologie bronco-polmonari associate come la sarcoidosi, la fibrosi polmonare, la sclerodermia, la TBC, la BPCO e le bronchiectasie. Recenti studi hanno messo in evidenza un'incidenza maggiore di 2-4 volte di carcinomi bronco-polmonari in pazienti portatori di BPCO rispetto a fumatori non BPCO. Dunque a parità di esposizione tabagica, sia per i carcinomi broncopolmonari che per la BPCO si può ipotizzare la compartecipazione patogenetica di fattori genetici ed ambientali comuni (4).

L'esposizione cronica al tabacco determina l'accumulo di alterazioni genetiche che rappresentano il primo stadio nello sviluppo delle lesioni preneoplastiche e neoplastiche. Per questo motivo l'abolizione dell'abitudine al fumo dovrebbe rappresentare il primo passo nella prevenzione primaria.

Un uomo che fuma ha una probabilità 23 volte maggiore di ammalarsi di cancro al polmone rispetto ad un non fumatore mentre per le donne la probabilità è 13 volte maggiore. Se un fumatore smette di fumare il rischio di sviluppare malattia dopo 10-15 anni dall'interruzione si riduce ma dati recenti fanno pensare che il rischio nell'ex-fumatore non si azzeri mai. Anche il fumo passivo ha un ruolo, infatti vi è un aumento del rischio del 30% nei mariti di donne fumatrici, del 20% nelle mogli di fumatori e del 16-19% per l'esposizione al fumo nel posto di lavoro (1).

Nonostante il fumo sia considerato il principale responsabile dello sviluppo del cancro al polmone, soltanto il 10-16% dei fumatori sviluppa nel corso della propria vita

una neoplasia polmonare grazie all'intervento di complessi meccanismi di riparazione cellulare e di inattivazione della carcinogenesi (3).

Vi sono geni coinvolti nel metabolismo dei composti chimici ad attività mutagenica e nel controllo della crescita cellulare. Come per altre neoplasie anche nel tumore del polmone sono stati individuati geni che stimolano la proliferazione cellulare, cosiddetti oncogeni, ed altri che la impediscono, gli anti-oncogeni e geni coinvolti nell'apoptosi (morte programmata cellulare) (5).

Le mutazioni di questi oncogeni rendono il DNA delle cellule tumorali diverso da quello delle cellule normali. Questo tipo di DNA riscontrabile nel siero di pazienti neoplastici, risulta indipendente dallo stadio della malattia e sembra essere correlato con la massa tumorale (5).

Il ritardo diagnostico di questa patologia è da imputarsi essenzialmente alla assenza di sintomi e segni specifici che si presentano spesso solo a malattia avanzata, è per questo che programmi di prevenzione secondaria, ovvero di anticipazione diagnostica potrebbero avere un ruolo quantomeno nell'identificazione di neoplasie in stadi meno avanzati.

Studi che hanno utilizzato come metodica di screening la radiografia standard del torace (Rx) o la citologia sull'espettorato non si sono però dimostrati utili ai fini della diagnosi precoce del cancro del polmone, in particolare non si sono dimostrati efficaci nella riduzione della mortalità per questa patologia (6).

Attualmente è in corso negli Stati Uniti il programma pilota di diagnosi precoce di cancro del polmone denominato ELCAP (Early Lung Cancer Action Project) iniziato nel 1999 e che ha recentemente fornito i primi risultati su 1000 pazienti fumatori sottoposti a tomografia computerizzata (TC) torace dimostrando la possibilità di individuare un maggior numero di tumori polmonari in stadi precoci (7). Questo studio però, non prevedendo un gruppo controllo, non riesce a fornire risultati sul reale beneficio in termini di aumento delle sopravvivenza dei pazienti affetti da tumore polmonare sottoposti a screening.

Per questo motivo sono in progetto negli Stati Uniti con il gruppo NCI, in Francia con il progetto DepiSCAN, oltre che in Belgio ed Olanda studi pilota randomizzati con gruppo di controllo. Anche in Italia sono in programma alcuni studi di diagnosi precoce che prevedono due gruppi randomizzati, uno dei quali non sottoposto a TC, rappresenta il gruppo di controllo (8). Gli studi randomizzati finora proposti utilizzano come braccio di controllo pazienti che non verranno sottoposti a TC del torace ma invitati alla prevenzione primaria tramite la disassuefazione al fumo. Un altro programma associa all'indagine morfo-

gica con TC del torace, uno studio biologico/funzionale con tomografia ad emissione di positroni (PET) ed uno genetico tramite l'applicazione della biologia molecolare al plasma od all'espettorato dei pazienti (9).

La TC del torace tuttavia produce un numero elevato di falsi positivi che rappresentano il maggior ostacolo nell'accettazione di programmi di screening su vasta scala; per tale motivo la ricerca è continuamente impegnata nella scoperta di nuovi metodi diagnostici, capaci di identificare anomalie molecolari tramite biomarcatori per sviluppare un'adeguata anticipazione diagnostica e la sorveglianza delle persone a rischio su materiale biologico ottenuto con procedure non invasive come l'espettorato ed il plasma. Questo tenuto conto del fatto che specifiche alterazioni genetiche possono essere riscontrate non solo nel tumore invasivo, ma anche negli stadi precoci ed intermedi (metaplasia, displasia) della trasformazione come riscontrabile nella mucosa bronchiale morfologicamente sana di pazienti con tumore e di forti fumatori senza tumore (10).

Viene anche proposto di verificare il possibile utilizzo dei marcatori genetici nel monitoraggio clinico dei pazienti per la identificazione delle recidive o delle metastasi in stadio precoce ed in assenza di segni di ripresa della malattia.

Tra i biomarcatori notevole interesse riscontrano oggi gli acidi nucleici e le loro alterazioni.

L'esistenza degli acidi nucleici (DNA e RNA) extracellulari nel sangue non è un concetto nuovo. La prima segnalazione di presenza di DNA circolante risale al 1948, quando Mandel e Metais dimostrano che DNA ed RNA possono essere trovati nel siero sia di individui sani che malati (11). Solo però 30 anni dopo (1977) viene pubblicato un lavoro che dimostra che in pazienti affetti da cancro vi è una quantità maggiore di DNA circolante rispetto ad individui sani, in particolare livelli più alti si riscontrano in pazienti con malattia metastatica (12). Gli studi che valutano la diversa concentrazione di DNA libero plasmatici, tra pazienti affetti da tumore del polmone e soggetti sani, sono molteplici ed utilizzano metodiche e procedure di analisi dei dati diverse (13). Alla fine degli anni ottanta numerosi studi hanno dimostrato inoltre che nel DNA circolante dei pazienti affetti da tumore erano riscontrabili le stesse alterazioni genetiche presenti nel tumore primitivo (mutazioni di oncogeni, perdita dell'eterozigotità, instabilità dei microsatelliti) a conferma dell'origine del DNA circolante dal tumore nativo (14). Tra le ipotesi in causa per la presenza in circolo del DNA nativo vi sono il rilascio attivo da parte del tumore, la rottura delle cellule neoplastiche o metastatiche, la necrosi (morte cellulare non programmata) o l'apoptosi (morte

cellulare programmata) delle cellule neoplastiche. Recentemente è stata eseguita la messa a punto di tests sensibili di quantificazione del DNA libero circolante nel plasma, molti dei quali utilizzano la metodica della Real-Time PCR quantitativa, che permette di quantificare il DNA circolante nell'ordine di picogrammi (pg) (13). La quantificazione del DNA circolante tramite una raffinata metodica molecolare potrebbe quindi rappresentare un utile strumento diagnostico per discriminare pazienti con tumore rispetto a individui sani e potenzialmente identificare gli individui ad aumentato rischio di cancro quali i forti fumatori nelle fasi molto iniziali della malattia. Questi tests possono inoltre essere utilizzati come metodi non invasivi per identificare precocemente la ripresa e metastasi tumorali durante il follow-up dei pazienti (15). Sozzi et al. (15) hanno dimostrato che la concentrazione media di DNA circolante nei pazienti affetti da neoplasia polmonare risulta 8 volte superiore rispetto ai controlli sani. Su questa scoperta si basa il nostro studio, il quale si propone di avvalorare i risultati già descritti e di aprire eventualmente la strada ad una possibile standardizzazione della metodologia.

## MATERIALI E METODI

### 1. Reclutamento dei pazienti e dei controlli

Il progetto, approvato dal comitato etico aziendale, in Marzo 2005, con protocollo n° 7847/2005, è iniziato nell'Aprile 2005. Era previsto l'arruolamento di 150 casi in 3 anni. Tutti i pazienti prima del prelievo sono stati adeguatamente informati sulle finalità dello studio ed hanno aderito firmando un consenso informato dettagliato nei particolari dello studio. I dati anamnestici sono stati raccolti in schede e successivamente in un data base in cui sono stati inseriti i dati completi per singolo paziente comprendenti l'età, l'abitudine tabagica, le co-patologie, lo stadio patologico della malattia, il tipo di intervento ed il follow-up. I criteri di inclusione erano la presenza di NSCLC accertato tramite diagnosi cito-istologica, l'intervento chirurgico con finalità curative e l'adesione allo studio dopo consenso informato. I criteri di esclusione erano una pregressa neoplasia, psicosi gravi, assenza di consenso informato.

Le provette sono state numerate con codici corrispondenti al codice paziente secretato nelle schede e nel data base. I controlli provengono da donatori sani del centro trasfusionale e da volontari ospedalieri, sono stati selezionati per sesso ed età in modo da risultare il più omogenei possibile rispetto ai casi. Il numero inizialmente previsto era di 150

fumatori e 150 non fumatori da arruolare in 3 anni. Anche i controlli sono stati informati sulle finalità dello studio ed hanno partecipato firmando un consenso informato.

### 2. Raccolta dei campioni

Sia i pazienti che i controlli sono stati sottoposti a prelievo venoso di 18 ml di sangue in due provette sottovuoto da 9 ml contenenti K3-EDTA come anticoagulante. Le provette sono state inviate entro 1 ora dal prelievo al laboratorio dove sono state immediatamente processate per la preparazione del plasma.

### 3. Trattamento e conservazione di campioni

Il plasma è stato separato dalla frazione cellulare tramite 2 centrifugazioni a 2500 rpm a 4°C per 10 minuti, e successivamente conservato in azoto liquido.

### 4. Estrazione del DNA circolante

L'estrazione del DNA è stata ottenuta da un volume di 1ml di plasma tramite l'utilizzo di un kit commerciale della ditta Qiagen (QIAmp DNA Mini Kit), che si basa sull'uso di resine a scambio ionico che legano il DNA presente in soluzione quando passa attraverso la colonnina. Vengono eseguite le seguenti fasi: deproteinizzazione del campione, trasferimento del campione in colonna per assorbimento, rimozione di inibitori, rimozione dei contaminanti, eluzione del DNA in un volume finale di 50 µl di buffer. I campioni contenenti il DNA sono stati conservati in freezer a -20°C fino all'utilizzo.

### 5. Quantificazione del DNA estratto

La quantificazione del DNA circolante plasmatico è stata effettuata tramite Real-Time PCR quantitativa (Smart Cycler II Sequence Detection System; Cepheid). La tecnica si basa sulla rilevazione e quantificazione di un reporter fluorescente capace di produrre un segnale che aumenta in modo proporzionale alla quantità di prodotto PCR della reazione. Il reporter fluorescente è legato ad un'estremità di una sonda specifica per il gene di interesse ed è mantenuto spento dalla vicinanza di un quencher legato all'altra estremità della sonda. Quest'ultima si lega al gene che deve essere amplificato e quando la PCR ha inizio la sonda viene degradata dalla DNA polimerasi. La digestione della sonda fa sì che il reporter ed il quencher si allontanino e il reporter sia così in grado di emettere fluorescenza. Il sistema di PCR utilizza quindi due primers di amplificazione e una sonda (probe) fluorogena specifica per il frammento da analizzare (entrambi forniti dalla ditta Sigma Proligo). La sonda è marcata all'estremità 5' con FAM (reporter) mentre all'estremità 3' con TAMRA

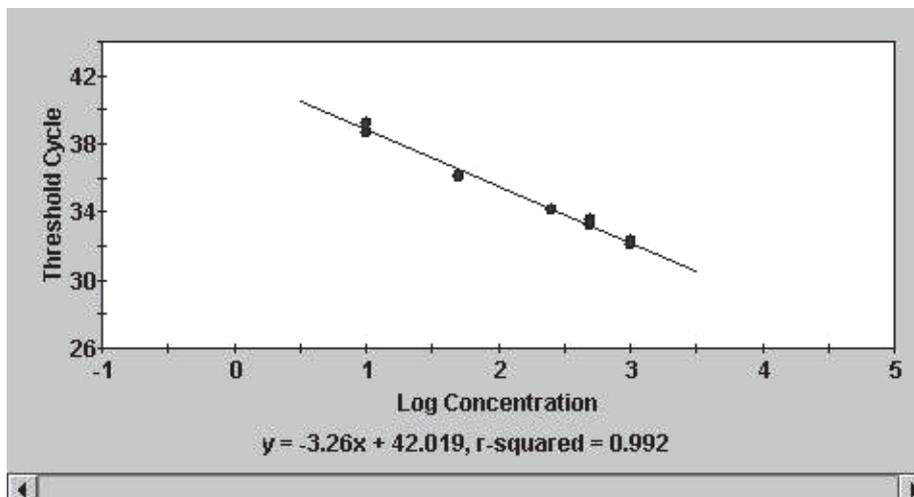


Figura 1 - Curva Standard.

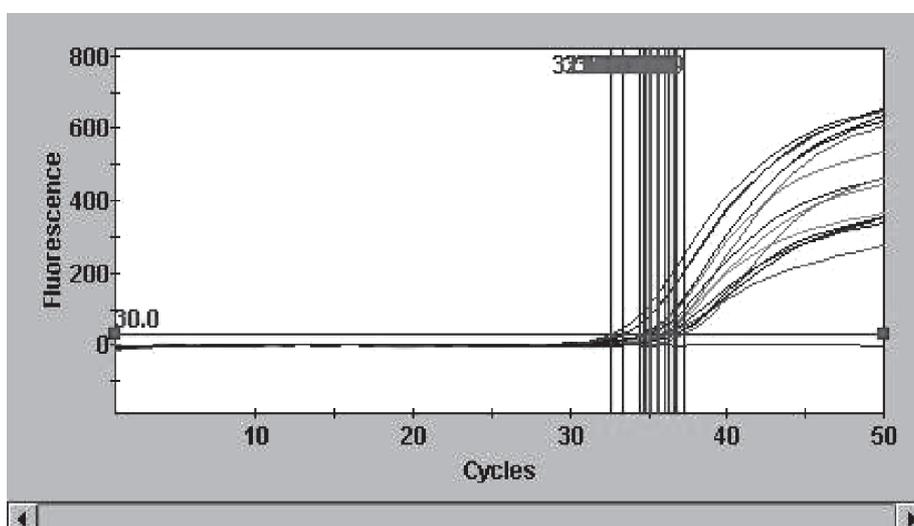


Figura 2 - Curve di amplificazione dei campioni con relativo Ct.

(quencher). Le sequenze dei primers utilizzati sono: primer forward: 5'-GGCACACGTGGCTTTTCG-3'; reverse: 5'-GGTGAACTCGTAAGTTTATGCAA-3'; probe: FAM 5'-TCA GGA CGT CGA GTG GAC ACG GTG-3' TAMRA.

Si è utilizzato come gene target hTERT, mappato sul cromosoma 5p15.33 ed il frammento che viene amplificato è di 98 bp (dalla posizione 13059 alla 13156, GeneBank accession number AF128893).

L'amplificazione è stata effettuata in un volume totale di 25 µl, contenenti 2 µl di DNA genomico estratto, 12,5 µl di FluoCycle (Mix per probe real time PCR; EuroClone), 2,5 µl di probe (0,2 µmoli/L), 2,5 µl di primer forward (0,3 µmoli/L), 2,5 µl di primer reverse (0,3 µmoli/L) e 3 µl di acqua sterile.

Ad un'iniziale denaturazione a 95°C per 10 min sono seguiti altri due step uno a 95°C per 10 secondi ed uno a 60°C per 40 secondi per 50 cicli di amplificazione.

I campioni sono stati analizzati in triplicato e ad ogni corsa si è associato un bianco come controllo negativo.

Per la quantificazione del DNA circolante si costruisce una curva di calibrazione tramite l'utilizzo di uno standard (Human Genomic DNA della ditta Roche) a varie concentrazioni: 1 ng, 500, 250, 50 e 10 pg, utilizzando hTERT come gene target.

La curva standard si è ottenuta ponendo in ascissa il log della concentrazione degli standard e in ordinata i valori dei cicli soglia (Ct) (figura 1). Per ciclo soglia si intende il numero di ciclo in cui una reazione di PCR raggiunge un incremento di fluorescenza statisticamente significativo,

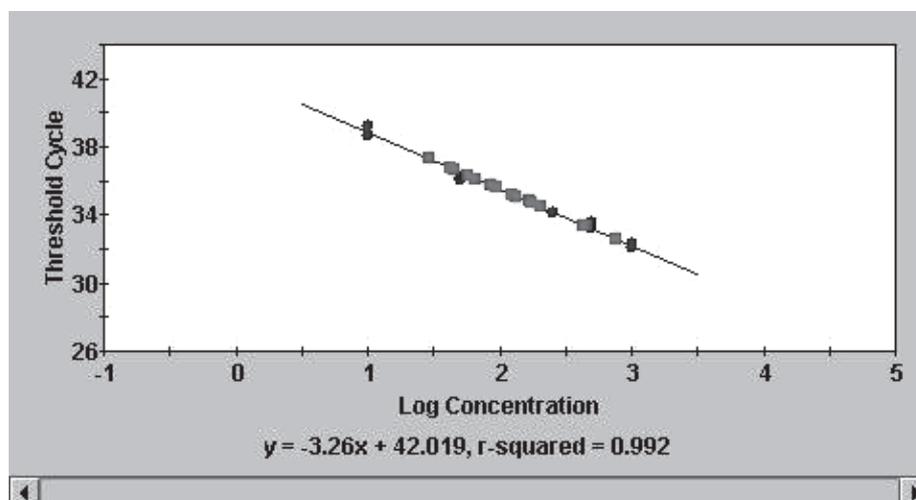


Figura 3 - Estrapolazione delle concentrazioni di DNA dei campioni delle curve standard.

al di sopra del background dello strumento.

Dopo la costruzione della curva standard si passa all'amplificazione dei campioni e quindi alla determinazione del corrispondente Ct. Esiste infatti una relazione logaritmica lineare tra il numero di copie iniziali del gene presente nel campione ed il valore del ciclo soglia: maggiore è la quantità di bersaglio presente all'inizio della reazione, meno cicli saranno necessari per raggiungere il valore del Ct. Una differenza di 10 volte nella concentrazione modifica il valore Ct di 3,3 cicli e due campioni che si discostano tra loro di un solo ciclo presentano un fattore 2 di differenza nel titolo.

Riportando il valore del Ct ottenuto, per ogni campione, sulla curva standard, si può determinare la quantità di DNA presente nel campione (figura 2).

I dati sono stati analizzati tramite un software in dotazione nello strumento Smart Cyler (Cepheid), i cicli soglia ottenuti sono stati estrapolati dalla curva standard (figura 3).

Ogni campione è stato analizzato in triplicato per permettere una più precisa determinazione della quantità iniziale di DNA; dei tre dati ottenuti vengono mantenuti validi solo quelli che presentano una deviazione standard inferiore al 20% della media dei tre valori (circa 0,5 cicli).

#### 6. Follow-up

I pazienti sono stati richiamati a 6, 12 e 24 mesi per eseguire un prelievo di controllo e valutare l'andamento del follow-up clinico. Questa fase è servita a correlare l'andamento del DNA circolante nel tempo in rapporto

allo stato 'disease free', presenza di recidiva, metastasi o secondo tumore.

#### 7. Analisi statistica

La curva ROC è stata costruita per valutare le capacità diagnostiche delle concentrazioni DNA. Ogni valore del DNA è stato utilizzato come cut-off per calcolare i valori di sensibilità e di specificità, definendo così l'area sotto la curva (AUC).

La distribuzione dei valori di DNA è stata normalizzata attraverso la trasformazione logaritmica; tuttavia i valori non trasformati sono stati utilizzati nelle analisi descrittive.

L'associazione tra le elevate concentrazioni di DNA e la presenza di neoplasia polmonare è stata esaminata con un modello di regressione logistica binaria nel quale la variabile dipendente è la presenza di neoplasia. I risultati sono espressi in termini di OR con i relativi IC al 95%. Gli IC che non contengono l'unità sono considerati statisticamente significativi.

La potenziale associazione tra il logaritmo dei valori di DNA e le variabili demografiche, cliniche e patologiche nel cancro del polmone, è stata studiata attraverso un modello di regressione multipla lineare.

Il confronto delle concentrazioni mediane di DNA, rilevate nel periodo di follow-up, è stato fatto con il test di Wilcoxon per dati appaiati e con il test non parametrico Mann-Whitney per campioni indipendenti.

I risultati sono considerati statisticamente significativi ad un livello di  $p < 0.05$ .

Tutte le analisi sono state effettuate con il software SPSS (version 14.0; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

**RISULTATI**

*Distribuzione dei valori di DNA tra sani e malati*

Centocinquantaquattro pazienti con cancro al polmone: 146 fumatori (94,8%), 8 non fumatori (5,2%), 125 (81%) maschi e 29 (19%) femmine, età complessiva media  $66,4 \pm 9,2$  anni e settantanove persone sane: 43 fumatori (54,4%) e 36 non fumatori (45,6%), 60 maschi (76%) ed 19 femmine (24%), età complessiva media  $55,5 \pm 7,6$  anni, provenienti da donatori del centro trasfusionale e volontari sani del laboratorio, chiamati successivamente casi e controlli, sono stati sottoposti ad un prelievo venoso da cui è stato preparato il plasma.

Il numero di controlli è risultato inferiore al previsto per difficoltà di arruolamento. Il numero è stato comunque considerato adeguato per eseguire le analisi preliminari di confronto tra gruppi.

L'analisi statistica definitiva è stata poi eseguita su 151 casi, poiché 3 sono stati esclusi a posteriori perché con metastasi di ADK del colon occulto.

Il DNA circolante è stato estratto dal plasma e successi-

vamente quantificato mediante l'utilizzo della real-time PCR. Questa tecnica basandosi sul legame di una sonda specifica alle molecole di DNA, fornisce una stima reale della loro concentrazione nel campione analizzato, tuttavia questa quantità potrebbe essere sottostimata, in quanto è possibile che alcune molecole di DNA siano state danneggiate dal procedimento di estrazione, in modo tale che la proporzione di DNA complementare alla sonda non sia intera e la sonda non sia più in grado di appaiarsi. Ripor-tiamo di seguito il risultato della quantificazione del DNA circolante nei pazienti e nei controlli (figura 4). L'analisi è stata eseguita eliminando due valori outliers dei controlli e tre valori dei casi in quanto all'esame istologico definitivo risultati metastasi polmonari da neoplasia del colon.

Dalla distribuzione delle concentrazioni di DNA nei due gruppi di casi (malati) e di controlli si nota che mediamente i valori sono più alti nel primo gruppo (12,8 vs 2,9). Tale differenza è statisticamente significativa ( $p < 0.001$ ) anche se non evidenzia in modo marcato la stessa discriminazione netta tra i due gruppi presente in altri studi.

Sul gruppo dei casi non fumatori non si possono trarre

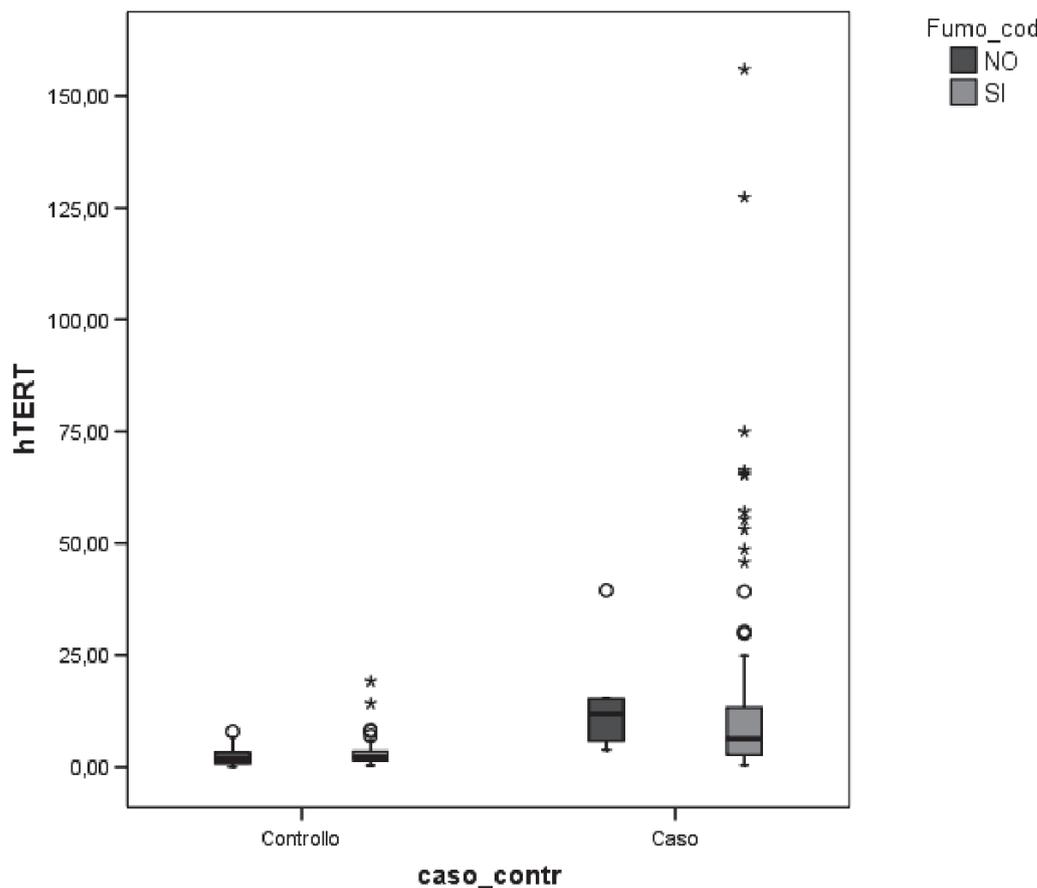
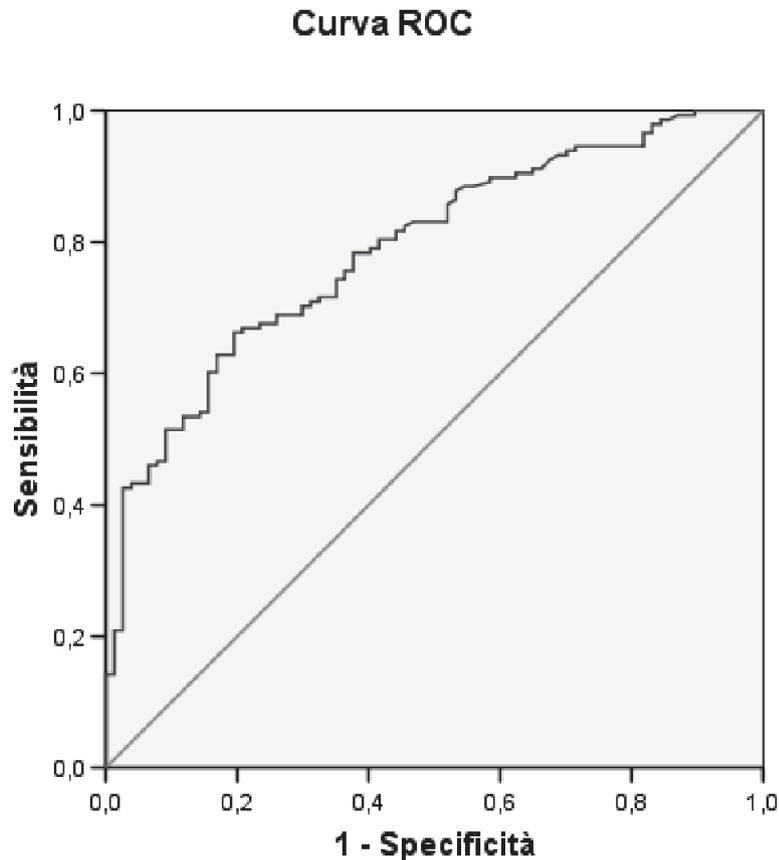


Figura 4 - Distribuzione delle concentrazioni di DNA tra casi e controlli.



I segmenti diagonali sono prodotti dai casi pari merito.

Figura 5 - Curva ROC.

molte conclusioni vista la bassa numerosità (5 casi). I fumatori in entrambi i gruppi presentano valori di DNA più elevati, ma nel gruppo dei casi la variabilità del dato è più ampia (la SD è pari a 21,1 vs 3,6).

#### *Sensibilità e specificità del test*

Per valutare il potere diagnostico della concentrazione di DNA circolante, è stata sviluppata la curva ROC. L'analisi ROC viene effettuata attraverso lo studio della funzione che lega la sensibilità (probabilità di ottenere un risultato vero positivo nella classe dei malati) al complementare della specificità (probabilità di ottenere un risultato falso positivo nella classe dei non malati). Nella rappresentazione grafica (figura 5) si può vedere che tanto più la curva si avvicina all'angolo superiore sinistro tanto più è accurato il test, mentre quando la curva si avvicina alla diagonale il test risulta essere poco accurato, con capacità discriminatoria peggiore e senza alcun significato clinico. L'area sottesa dalla curva ROC rappresenta un indice sintetico dell'abi-

lità complessiva del test nel discriminare tra sani e malati. Tanto più l'area si avvicina all'unità tanto maggiore è la sua capacità discriminatoria.

Dai nostri dati l'area al di sotto della curva ROC è risultata 0,79 (95% intervallo di confidenza=0,710-0,835,  $p<0,001$ ).

Al fine di minimizzare gli errori diagnostici bisognerebbe scegliere il valore soglia corrispondente al punto più prossimo all'angolo superiore sinistro. Questa metodologia ci consente di scegliere il cut-off in modo da modulare la sensibilità e la specificità più conformi alla situazione in cui si sta operando.

Ad esempio al valore soglia di concentrazione di DNA pari a 3 ng/mL corrisponde una sensibilità (SE) = 0,71 (quota di malati positivi al test-VP) ed una specificità (1-SP) = 0,32 (quota di sani positivi al test - FP). Oppure concentrazioni di DNA pari a 2,5 che danno una sensibilità pari al 78% (malati VP) ed una specificità (1-SP) del 60% circa.

La scelta del valore soglia dipende da cosa siamo disposti

a privilegiare: valori alti di sensibilità evitano il più possibile che sfuggano i soggetti alla diagnosi ma comportano un rischio aumentato di porre diagnosi in soggetti sani (aumenta 1-SP). Tale rischio potrebbe essere accettabile se i positivi al test fossero comunque sottoposti a un test di conferma prima di fare diagnosi definitiva.

Si è scelto il valore 2 ng/mL come migliore cut-off con sensibilità dell'85% ed una specificità del 48%. A questo valore di cut-off il test ha un valore predittivo positivo del 76%, un valore predittivo negativo del 63,8% ed un'accuratezza del 73%.

Tenendo come valore di riferimento il valore di cut-off pari a 2 ng/mL il rischio relativo di malattia per classi di DNA è evidenziato nella tabella 1.

All'aumentare delle concentrazioni di DNA aumenta il rischio di patologia: a concentrazioni comprese tra 2,1 e 6,5 corrisponde un rischio di malattia di oltre 2 volte rispetto a concentrazioni inferiori o uguali a 2; concentrazioni elevate superiori a 6,5 presentano un rischio di malattia di oltre 8 volte.

Utilizzando i risultati della curva ROC, è stata inoltre eseguita l'analisi della performance del test rispetto ai diversi valori di soglia (tab. 2) da cui risulta che con una soglia pari a 2 si ha una probabilità di malattia pari al 75% quando il test risulta positivo (VPP). Aumentando la soglia, ad esempio 4, diminuisce la capacità di identificare i veri positivi ma aumenta la capacità predittiva a posteriori del test (VPP = 85%).

#### Tipo intervento e terapie neoadiuvanti

Dei 155 pazienti entrati nello studio gli operati sono stati 154 (1 paziente escluso dopo diagnosi di metastasi ossea al ricovero per intervento). Degli operati 14 erano stati

sottoposti a chemioterapia neoadiuvante (9%), 2 a radioterapia neoadiuvante (1,3%) e 3 a chemio/radioterapia concomitante neoadiuvante (2%).

I pazienti sono stati sottoposti a resezione segmentaria atipica in 9 casi (5,8%), a resezione tipica in 1 caso (0,6%), a lobectomia in 113 casi (74%), bilobectomia in 8 casi (5,2%) ed a pneumonectomia in 18 casi (11,7%). Le toracotomie esplorative sono state 4 (2,6%). Considerata l'esiguità dei pazienti sottoposti a terapie neoadiuvanti, questa variabile non è stata inserita nel modello di regressione lineare.

#### Anatomia patologica e Stadio

Per quel che riguarda l'analisi dell'istotipo, del grading e dello stadio i risultati sono stati i seguenti:

65 pazienti carcinoma epidermoide (42,5%), 61 pazienti adenocarcinoma (39,8%), 12 pazienti carcinoma bronchio-alveolare (7,8%), 3 pazienti carcinoma neuroendocrino a grandi cellule (2%), 2 pazienti carcinoide tipico (1,3%), 3 pazienti carcinoma misto (2 epidermoide/adenocarcinoma, 1 epidermoide/neuroendocrino), 3 (2%) metastasi da adenocarcinoma del colon (riscontro occasionale), 2 (1,3%) con diagnosi citologica di neoplasia polmonare non a piccole cellule, 2 carcinoma a grandi cellule (1,3%), 1 tumore rabdoide (0,6%), 1 tumore sarcomatoide del polmone (0,6%), 1 sarcoma (0,6%).

Nei pazienti con neoplasia polmonare il grading è risultato G1 (ben differenziato) in 17 pazienti (11,5%), G2 (mediamente differenziato) in 41 pazienti (27,7%) e G3 (scarsamente differenziato) in 90 pazienti (60,8%).

I pazienti in Stadio IA sono risultati 33 (21,5%), in stadio IB 47 pazienti (30,7%), in stadio IIA 5 pazienti (3,2%), in stadio IIB 13 pazienti (8,5%), in stadio IIIA 24 pazienti (15%) (19 con linfonodi N2 positivi, 4 con infiltrazione di parete T3 e linfonodi N1 positivi), in stadio IIIB 18 pazienti (12%) (15 pazienti con doppio nodulo nello stesso lobo polmonare, 3 pazienti con linfonodi N3 positivi) e 14 pazienti in IV stadio (9%) (13 pazienti con doppia localizzazione in lobi polmonari differenti, 1 paziente con metastasi cerebrale). Un paziente è stato sottoposto a lobectomia per un carcinoma in situ.

**TABELLA 1 - Regressione logistica associazione DNA/neoplasia**

	OR	95% CI per EXP (B)		Sig. p
		Inferiore	Superiore	
≤2	1			
2.1-6.5	2,33	1,04	5,17	0,038
> 6.5	8,59	3,28	22,45	0,000

**TABELLA 2 - Performance del test**

Cutoff	Sensibilità	95% IC	Specificità	95% IC	VPP	VPN
2	85,8	81,6-89,6	46,8	38,9-53,9	75,1	63,8
4	63,5	59,1-67,2	78,5	70,1-85,3	84,7	53,4
6	51,4	47,3-54,2	87,3	79,7-92,7	88,4	48,9
10	32,4	29,1-34,1	94,9	88,7-98	92,3	42,9

### Analisi univariata

Per quanto riguarda l'associazione tra alcune variabili demografiche, cliniche e la presenza/assenza di patologia, quest'ultima risulta associata statisticamente con il fumo (88% nei casi, 12% nei controlli,  $p < 0,01$ ).

I valori di DNA sono stati classificati in 3 classi:  $\leq 2$  ng/mL, 2.1 - 6.5 ng/mL,  $> 6.5$  ng/mL. Valori più elevati di DNA sono più frequenti nei casi che nei controlli (all'aumentare dei valori di DNA aumentano le percentuali dei casi,  $p < 0,01$ ).

Successivamente studiando l'associazione tra classi di DNA con assenza/presenza patologia, stratificato il tutto per il fumo, si ha che in entrambi gli strati FUMO SI/NO, la differenza % dei valori di DNA nei due gruppi casi/controlli è statisticamente significativa, quindi valori più alti di DNA sono sempre nei casi anche stratificando per abitudine al fumo. C'è solo da sottolineare che per quanto riguarda i non fumatori, le numerosità sono ridotte e quindi non si possono generalizzare le conclusioni.

Quindi l'analisi va concentrata solo sui fumatori. Per valori  $> 2.1$  la % di casi è più del triplo di quella dei controlli.

### Analisi multivariata

Prima di eseguire l'analisi di regressione lineare, i valori di DNA sono stati normalizzati attraverso la trasformazione logaritmica e poi utilizzata come variabile dipendente. Le variabili esplicative inserite nell'analisi sono: età in classi, sesso, fumo, stadio e grading.

L'analisi multivariata ha mostrato qualche dato interessante rispetto all'età ed il sesso. I valori di DNA sono significativamente associati con la classe di età  $\leq 60$  anni rispetto a quella  $\geq 71$  anni. Cioè, i soggetti di età inferiore o uguale a 60 anni sono protettivi sulla concentrazione di DNA (o meglio, sono associati negativamente) rispetto agli ultrasessantenni; quelli di età superiore 61-70 anni, a loro volta protettivi rispetto agli ultrasessantenni ma in misura minore rispetto ai più giovani.

Anche il sesso è associato con i valori di DNA in modo negativo (maschi rispetto alle femmine, categoria di riferimento): le femmine presentano in media valori più alti. Tutte le altre variabili, fumo, grading e stadio non sono risultate statisticamente significative.

I pazienti con adenocarcinoma presentano valori di DNA più elevati rispetto a quelli con carcinoma epidermoide, tuttavia l'analisi statistica sull'istotipo, data la bassa capacità predittiva del test, non è stata eseguita per inadeguatezza dei gruppi.

Purtroppo il modello di regressione non risulta avere una buona capacità predittiva, poiché la quota di varianza è molto bassa = 10% (R quadro). Comunque in questa pri-

ma versione permette di trarre conclusioni clinicamente significative anche se non raggiungono la significatività statistica.

Inoltre considerando come variabili indipendenti soltanto sesso ed età, ovvero le uniche variabili risultate significative, si osserva che l'età correla come variabile quantitativa in modo positivo (ogni aumento di 1 anno corrisponde all'aumento di 0,17 ng/ml nella concentrazione di DNA circolante), mentre il sesso correla negativamente (i maschi in media hanno valori di DNA circolante inferiori rispetto alle femmine).

### Distribuzione dei valori di DNA tra prime diagnosi e recidive

Novanta pazienti sono stati reclutati al follow up di 6 mesi (60,8%). Dodici casi di recidive di cui 2 decessi (2/90 = 2,2%)

Cinquantasei pazienti sono stati reclutati al follow up a 12 mesi (56/148 = 37,8%). A 12 mesi 6 casi di recidive, ma nell'arco temporale precedente tra i 6 e 11 mesi ci sono stati 5 casi di decesso.

Si evidenzia una riduzione significativa delle concentrazioni di DNA a 6 mesi nei casi liberi da malattia ( $p = 0,018$ ) (figura 6), differenza non osservata nei casi con recidiva

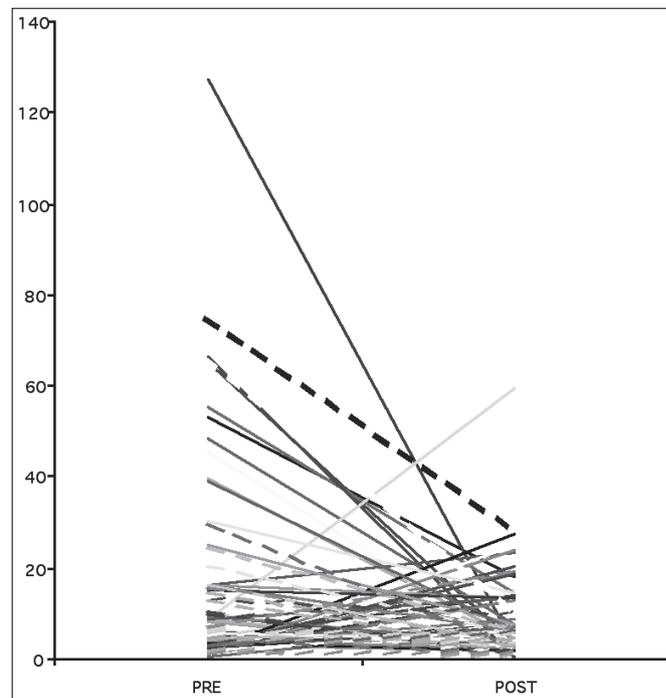


Figura 6 - Riduzione dei livelli di DNA a 6 mesi nei sani.

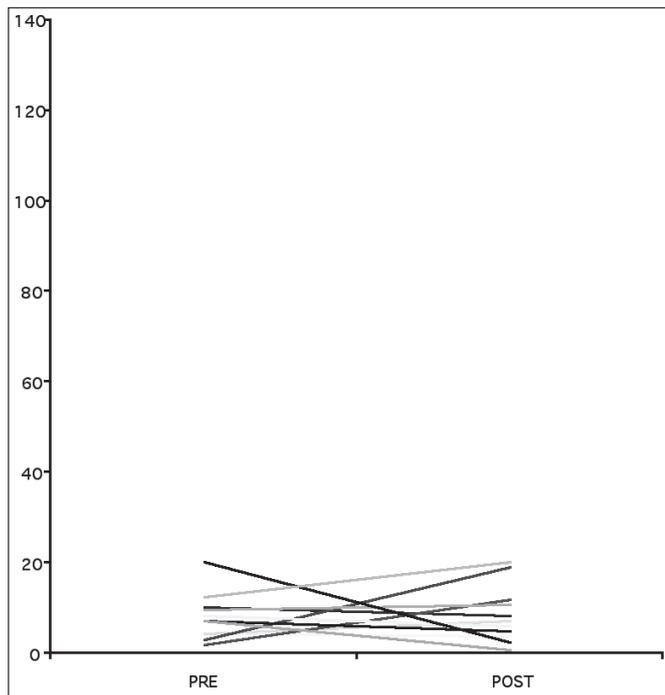


Figura 7 - Riduzione dei livelli di DNA a 6 mesi nelle recidive.

(figura 7) , mentre tra i 6 ed i 12 mesi i valori sono risultati sovrapponibili.

Inoltre, confrontando nello stesso periodo di follow up (6 mesi e 12 mesi) l'andamento dei valori di DNA tra vivi e recidive emerge che le differenze non sono statisticamente significative; probabile che ciò sia dovuto allo sbilanciamento numerico dei gruppi messi a confronto (Tabelle 3 e 4). Quindi non si può dedurre che i casi con recidive abbiano valori di DNA significativamente superiori rispetto ai vivi, sarebbe opportuno aumentare il numero di casi.

**DISCUSSIONE**

La presenza di DNA circolante tumorale nel plasma di pazienti malati di tumore del polmone suscita grande interesse in quanto, con un semplice esame del sangue, si potrebbe disporre di un valido marker per un eventuale screening, per la diagnosi, la prognosi, la progressione della malattia e il monitoraggio della risposta alla terapia. Purtroppo però la standardizzazione del test è resa difficoltosa dalla mancanza di uno standard adeguato e dall'utilizzo di differenti metodi di estrazione e quantificazione.

L'attenzione dei vari centri impegnati nello studio e nel trattamento del carcinoma broncopolmonare è rivolta all'identificazione delle anomalie molecolari attraverso l'utilizzo di biomarcatori, al fine di sviluppare un'adeguata anticipazione diagnostica e la sorveglianza delle persone a rischio. Specifiche alterazioni genetiche possono essere riscontrate non solo nel tumore invasivo, ma anche negli stadi precoci ed intermedi (metaplasia, displasia) della trasformazione come riscontrabile nella mucosa bronchiale morfologicamente sana di pazienti con tumore e di forti fumatori senza tumore (5). Come già osservato da altri gruppi di ricerca (15), ci siamo proposti di verificare l'utilizzo dei marcatori molecolari nel monitoraggio clinico dei pazienti per l'identificazione di recidive e di metastasi in assenza di segni di ripresa della malattia. L'analisi molecolare di campioni di sangue periferico utilizzando tecniche semplici ed automatizzabili, rappresenta più di una speranza per il futuro. Potrebbe infatti contribuire alla diagnosi precoce del carcinoma polmonare nei pazienti a rischio e permettere un'accurata sorveglianza, dei pazienti operati, durante il follow-up.

**TABELLA 3 - Follow up a 6 mesi: confronto tra vivi e recidive.**

	N	Minimo	10°	25°	Mediana	75°	90°	Massimo	Media	SD
<b>DNA 6 mesi</b>	<b>90</b>	0,69	1,55	2,62	<b>5,86</b>	12,64	19,78	59,24	<b>8,93</b>	10,09
vivi	78	0,7	1,57	2,52	5,56	12,58	19,6	59,24	8,25	9,03
recidive/decessi	12	0,69	1,17	3,75	7,66	16,96	47,36	59,06	12,69	15,8

**TABELLA 4 - Follow-up a 12 mesi: confronto tra vivi e recidive.**

	N	Minimo	10°	25°	Mediana	75°	90°	Massimo	Media	SD
<b>DNA 12 mesi</b>	<b>56</b>	0,34	1,2	2,32	<b>5,22</b>	11,87	28,12	69,77	<b>10,76</b>	15,21
vivi	50	0,34	1,21	2,22	5,13	11,7	26,92	69,11	10,22	13,72
recidive/decessi	6	0,67	0,67	2,87	6,02	26,69	---	69,77	16,4	26,42

La presenza in circolo di DNA libero è riscontrabile in pazienti con patologie maligne ma anche in soggetti sani e in pazienti affetti da patologie non maligne come ad esempio lupus eritematoso sistemico, artrite reumatoide, embolia polmonare, infarto del miocardio, traumi o procedure terapeutiche. Molti Autori concordano comunque sul fatto che le concentrazioni di DNA sono molto più elevate nei pazienti affetti da patologie maligne rispetto ai controlli sani (13,15,16). Numerose sono le ipotesi avanzate riguardo ai meccanismi di rilascio in circolo del DNA. Per quanto riguarda i soggetti sani si presume che il DNA circolante origini dalla morte cellulare dei linfociti o di altre cellule nucleate, mentre per i pazienti affetti da patologie neoplastiche si sono postulate varie ipotesi come ad esempio la lisi di cellule tumorali (17). A tal proposito tuttavia si è visto che in pazienti sottoposti a radioterapia, in cui è presumibile un aumento della necrosi cellulare e di conseguenza del DNA circolante, si assiste invece ad una diminuzione della concentrazione in circa il 40% dei casi (16). La radioterapia potrebbe infatti influire sul rilascio del DNA da parte della cellula neoplastica. Un ulteriore processo ipotizzato quale possibile meccanismo per il rilascio di DNA in circolo è l'apoptosi cellulare. Tuttavia è noto come questo meccanismo sia ridotto nelle cellule neoplastiche.

Sembra esistere una relazione tra DNA circolante e DNA del tumore, infatti numerosi lavori dimostrano come le alterazioni genetiche presenti in circolo siano le stesse evidenziabili nel DNA tumorale, anche se non nello stesso locus o allele. Queste alterazioni in loci o alleli differenti sono spiegabili con la presenza di cloni cellulari neoplastici con diverse mutazioni, che conferiscono alla cellula maligna caratteristiche peculiari come ad esempio la capacità di invadere il circolo sistemico e dare origine a metastasi (10). Le alterazioni molecolari riscontrate nel DNA circolante non sembrano comunque essere utili nei programmi di screening a causa dell'estrema variabilità di frequenza e della bassa specificità. Nel cancro del polmone ad esempio le alterazioni dei microsatelliti sono ristrette a singoli loci e non rappresentano un fenomeno generalizzato come in altre neoplasie. Pertanto la ricerca si è orientata verso un'analisi di tipo quantitativo, che sembra avere una performance migliore come saggio per un eventuale screening.

Gli Autori che in letteratura si sono occupati della differente concentrazione di DNA circolante in soggetti sani e malati di tumore del polmone, hanno evidenziato un incremento nella quantità di DNA libero nel plasma dei pazienti affetti da carcinoma broncopolmonare rispetto ai controlli (13). L'analisi quantitativa del DNA libero circolante si

è dimostrata un valido test diagnostico nel discriminare pazienti sani da quelli affetti da cancro del polmone e da coloro che presentano recidive precoci durante il follow-up. Sozzi et al. (15) hanno validato il DNA circolante nel plasma come potenziale marker diagnostico nel cancro del polmone e hanno dimostrato che la metodica da loro utilizzata presenta un'alta sensibilità ed un'alta specificità sia analizzando i risultati come distribuzione continua che valutando gli specifici cut-off. La concentrazione media nei pazienti affetti è risultata circa 8 volte maggiore rispetto ai controlli sani, la maggiore sensibilità (90%), la maggiore specificità (86%), il valore predittivo positivo (90%), il valore predittivo negativo (90%) sono stati ottenuti a concentrazioni di 9 ng/mL. Infine l'OR ottenuto ha dimostrato una stretta associazione tra la concentrazione di DNA plasmatico ed il rischio di sviluppo di NSCLC. Il livello di DNA plasmatico è risultato correlato all'età dei pazienti ed al sesso, mentre sono risultati non correlati la necrosi, l'infiltrato linfoide, il pattern di crescita, l'espressione di Ki67 o EGFR. Questi dati hanno suggerito un meccanismo di rilascio del DNA tumorale in circolo non associato al grado di necrosi e/o all'indice di proliferazione cellulare. Nei pazienti di età superiore a 55 anni, non fumatori, il DNA plasmatico medio è risultato 0,61 ng/mL, ampiamente inferiore rispetto ai fumatori sani. Il test basato sull'analisi quantitativa del DNA plasmatico può rivestire un ruolo come marcatore per la diagnosi precoce di cancro del polmone in pazienti ad alto rischio, in particolare in forti fumatori. Inoltre può essere utile nel follow-up degli operati e per identificare soggetti affetti da neoplasia da inserire eventualmente in trials di chemioprevenzione. Un aspetto da valutare nell'analisi dei dati della concentrazione del DNA circolante riguarda l'impatto delle metodiche di prelievo, estrazione e stoccaggio del campione e delle possibili variabilità connesse a queste fasi. Vi sono studi ad esempio che hanno ipotizzato, che la variabilità della concentrazione del DNA circolante possa essere influenzata dalle metodiche di estrazione e di quantificazione utilizzate (18). Sozzi et al. mettono inoltre in luce la criticità della valutazione quantitativa legata alla degradazione del DNA stesso la quale potrebbe essere causata dalla conservazione del DNA, sia nella forma estratta che come plasma congelato (19).

L'analisi quantitativa prevede la determinazione del cut-off, ovvero il valore al di sopra del quale il test viene considerato positivo. I tre studi che si basano sull'amplificazione di hTERT, catene pesanti delle Ig e beta-actina tramite PCR hanno evidenziato che valori di cut-off più bassi incrementano la sensibilità del test a spese di una più bassa specificità (13).

Nessuno di questi studi ha però stabilito un valore di cut-off utile per discriminare i soggetti sani dai malati nei programmi di screening, ed i pazienti liberi da malattia da quelli con recidiva durante il follow-up.

Il nostro studio ha confermato i dati della letteratura, stabilendo un valore di cut-off più basso (2 ng/ml) rispetto a quanto riportato da Sozzi et al. (15) e comunque definendo che concentrazioni più elevate di DNA sono correlabili con lo stato di malattia.

Non vi sono inoltre fattori prognostici associati con la concentrazione di DNA circolante. In letteratura non si sono evidenziate correlazioni con lo stadio della malattia e nemmeno con l'istotipo; non sono state inoltre dimostrate correlazioni con il fumo, in modo particolare con la quantità e la durata, né con alcuni parametri istologici come il grado di necrosi, l'infiltrato linfoide ed il pattern di crescita (13). Un solo studio ha evidenziato una proporzionalità diretta tra la quantità di DNA circolante e l'età dei pazienti (15).

I dati da noi ottenuti hanno messo in evidenza un'associazione a crescita logaritmica tra la concentrazione del DNA circolante l'età ed il sesso. Ovvero in media il DNA risulta più elevato nelle donne e nei casi cresce di 0,17 ng/ml per anno.

Per quanto riguarda invece la correlazione con la prognosi i dati sono discordanti. Anche il nostro studio non ha definito un'associazione statisticamente significativa tra recidiva, progressione, morte ed i valori di DNA nel follow-up. Si è evidenziato tuttavia un andamento clinico peggiore nei pazienti con un'elevata quantità di DNA libero nel plasma il che rende presumibile un valore prognostico associato ai valori rilevati.

## CONCLUSIONI

L'obiettivo dello studio era quello di valutare il ruolo diagnostico del DNA circolante nel cancro del polmone, nonché di validare un metodo adeguato e riproducibile per la sua quantificazione.

Sono stati reclutati e sottoposti ad un prelievo venoso per la preparazione del plasma 154 pazienti affetti da cancro al polmone e 79 controlli sani utilizzati come controllo. È stato estratto il DNA libero dal plasma, successivamente quantificato mediante l'utilizzo della Real-Time PCR.

Studi precedenti hanno dimostrato che la concentrazione di DNA libero nel sangue è maggiore nei pazienti con cancro rispetto alle persone sane; il nostro studio si è proposto di validare il metodo considerato più affidabile, valutare se fosse riproducibile per essere applicato nella diagnosi precoce di cancro al polmone, fornendo un valore

di cut-off da applicare nella pratica clinica.

Si è potuto dimostrare che esiste una correlazione tra quantità di DNA circolante e presenza di tumore al polmone, in particolare quantità elevate di DNA circolante indicano un rischio maggiore di essere affetti da cancro al polmone. La concentrazione di DNA circolante non si è rilevata utile nel distinguere pazienti con recidiva anche se sembra possibile dedurre un valore prognostico. L'analisi statistica delle variabili indipendenti età, sesso, fumo, stadio, grading ed istotipo è risultata significativa soltanto per le prime due variabili.

Lo studio del DNA nel plasma può aprire nuove strade per la ricerca translazionale e nuove strategie per identificare cambiamenti genetici potenzialmente predittivi di chemioresistenza o chemiosensibilità.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alberg AJ, Samet JM. *Epidemiology of lung cancer*. Chest 2003; 123: 21-49.
2. Fong KM, Yang IA, Zimmerman PV, Bowman RV. *Cochrane systematic reviews of treatments for lung cancer*. Respir Med 2005; 99: 1071-8.
3. Sethi T. *Lung cancer. Introduction*. Thorax 2002; 57: 992-3.
4. Keith R. *From chronic obstructive pulmonary disease to lung cancer*. In Voelker N and MacNee W (Eds). *Chronic obstructive lung disease*. BC Decker Inc, Hamilton – London 2002; 403-15.
5. Sozzi G. *Molecular biology of lung cancer*. Eur J Cancer 2001; 37: 63-73.
6. Huber RM, Stratakis DF. *Molecular oncology-perspectives in lung cancer*. Lung Cancer 2004; 45: s209-s213.
7. Henschke CI, Naidich DP, Yankelevitz DF, McGuinness G, McCauley DI, Smith JP et al. *Early lung cancer action project: initial findings on repeat screening*. Cancer 2001; 92: 153-9.
8. Flahault A, DepiSCAN. *DepiSCAN: a new method to evaluate lung cancer screening*. J Radiol 2002; 83: 1803.
9. Pastorino U, Bellomi M, Landoni C, De Fiori E, Arnaldi P, Picchio M et al. *Early lung-cancer detection with spiral CT and positron emission tomography in heavy smokers: 2-year results*. Lancet 2003; 41: 71-9.
10. Sozzi G, Oggionni M, Alasio L, Conte D, Tavecchio L, Pilotti S et al. *Molecular changes track recurrence and progression of bronchial precancerous lesions*. Lung Cancer 2002; 37: 267-70.
11. Mandel P, Mètais P. *Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme*. CR Acad Sci Paris 1948; 142: 241-3.
12. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. *Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy*.

- Cancer Res 1977; 37: 646-50.
13. Pathak AK, Bhutani M, Kumar S, Mohan A, Guleria R. *Circulating free DNA in plasma/serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool.* Clin Chem 2006; 52: 1833-42.
  14. Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. *Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients.* Eur J Cancer Clin Oncol 1987; 23: 707-12.
  15. Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C et al. *Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer.* J Clin Oncol 2003; 21: 3902-8.
  16. Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA. *Circulating DNA a new diagnostic gold mine?* Cancer Treat Rev 2002; 28: 255-71.
  17. Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. *Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance.* Mutat Res 2007; 635: 105-17.
  18. Herrera LJ, Raja S, Gooding WE, El-Hefnawy T, Kelly L, Luketich JD, Godfrey TE. *Quantitative analysis of circulating plasma DNA as a tumor marker in thoracic malignancies.* Clin Chem 2005; 51: 113-8.
  19. Sozzi G, Roz L, Conte D, Mariani L, Andriani F, Verderio P, Pastorino U. *Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays.* J Natl Cancer Inst 2005; 97: 1848-50.

Lo studio è stato finanziato dall'Associazione Vittorio Lodini per la Ricerca in Chirurgia

*Corrispondenza a:*

Dott. Massimiliano Paci  
Struttura Complessa Chirurgia Toracica  
Viale Risorgimento, 80  
42100 Reggio Emilia  
Tel: 0522/296929  
Fax: 0522/296626  
e-mail: paci.massimiliano@asmn.re.it