

QUANTIFICAZIONE DEL DNA LIBERO CIRCOLANTE NEL PLASMA COME MARCATORE DIAGNOSTICO DI CANCRO POLMONARE

L'idea di andare a ricercare il DNA libero da cellule (nudo) circolante nel plasma o nel siero venne qualche anno fa ad un fisiologo svizzero che, avendolo riscontrato nella linfa delle piante, volle scoprire se fosse presente anche nel plasma di pazienti con tumore in stadio avanzato. Con saggi radioimmunologici ne dimostro' la presenza. In tempi successivi dal nostro e da altri laboratori Americani sono stati pubblicati studi che indicavano l'origine tumorale del DNA circolante nel plasma dimostrando la presenza di alterazioni genetiche tipiche del DNA tumorale nel DNA plasmatico in pazienti con vari tipi di neoplasia quali i tumori della testa e del collo, polmone, colon, fegato, pancreas.

Recentemente nel nostro laboratorio ci siamo indirizzati alla messa a punto di test sensibili di quantificazione del DNA libero circolante nel plasma allo scopo di chiarire se una accurata quantificazione dei livelli totali di DNA plasmatico possa rappresentare un semplice, sensibile ed accurato strumento diagnostico per discriminare pazienti con tumore polmonare verso individui sani.

Il lavoro apparso nel fascicolo del 1 Novembre 2003 su Journal of Clinical Oncology (sotto riportato) descrive la messa a punto di un test preciso e sensibile di quantificazione del DNA libero circolante nel plasma plasmatico basato sull'uso della Real-Time PCR Quantitativa. Questa metodica permette un'accurata amplificazione quantitativa del DNA mediante monitoraggio ottico continuo di una reazione di PCR fluorogenica e arriva a quantificare fino a 1 genoma-equivalente, cioe' 6pg di DNA genomico, il contenuto di DNA di una singola cellula. Abbiamo utilizzato come gene indicatore il gene della trascrittasi inversa della telomerasi umana, hTERT, un gene a singola copia localizzato sul cromosoma 5p15.33.

Abbiamo quindi determinato la sensibilita' e la specificita' di questo test sul plasma in un largo studio caso-controllo di 100 pazienti con tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC) e 100 controlli appaiati per eta', sesso e abitudine al fumo (forti fumatori) raccolti presso l' Istituto Europeo di Oncologia di Milano. Inoltre abbiamo incluso un gruppo di 30 individui non fumatori appaiati per eta'. Abbiamo valutato l'efficienza diagnostica del test sul plasma mediante costruzione della receiver-operating characteristic curve (ROC). E' stata inoltre usata l'analisi di regressione logistica condizionale per stabilire il coefficiente di rischio (odd ratios) di sviluppare cancro polmonare negli individui che presentano elevati livelli di DNA plasmatico.

La concentrazione mediana del DNA circolante nel plasma dei pazienti e' risultata superiore di 8 volte a quella riscontrata nei controlli. L'area sotto la curva ROC e' risultata di 0.94 (95% CI = 0.907-0.973) suggerendo un ottimo potere discriminante del test molecolare (il massimo potere discriminante equivale a 1). E' stata stabilita per diversi valori di DNA circolante la sensibilita', la specificita', il valore predittivo positivo (PPV) e negativo (NPV). La concentrazione del DNA nel plasma e' risultata un forte fattore di rischio per cancro polmonare in quanto le concentrazioni nel tertile piu' alto (> 20 ng/ml) erano associate ad un rischio 85 volte maggiore rispetto a al tertile piu' basso (< 4 ng/ml). Il valore di DNA plasmatico nel gruppo degli individui non fumatori e' risultato inferiore ad 1 ng/ml indicando quindi quantita' molto basse di DNA in circolo negli individui non esposti al fumo.

In 35 dei pazienti con tumore polmonare valutati per la quantità di DNA plasmatico prima della chirurgia, abbiamo potuto studiare uno o più prelievi di plasma successivi per monitorare le variazioni nella concentrazione del DNA plasmatico durante il follow-up clinico (3-15 mesi dopo la chirurgia, tempo mediano 8 mesi). La concentrazione mediana dei successivi campioni di plasma ha mostrato una significativa diminuzione rispetto ai valori basali. In particolare l'analisi dei livelli di DNA plasmatico in relazione allo stato clinico della malattia ha evidenziato una concentrazione di DNA significativamente più bassa in 30 individui liberi da malattia rispetto a 5 in ripresa di malattia

In conclusione, questo studio ci ha permesso di dimostrare che la quantificazione del DNA circolante nel plasma tramite una raffinata metodica molecolare può rappresentare un utile strumento diagnostico per discriminare pazienti con tumore rispetto a individui sani e, potenzialmente, per identificare gli individui ad aumentato rischio di cancro quali i forti fumatori nelle fasi molto iniziali della malattia. Inoltre questo test può essere utilizzato come metodo non invasivo per identificare precocemente ripresa e metastasi tumorali durante il follow up dei pazienti.

Il lavoro è stato accompagnato da un Editoriale della rivista stessa (sotto riportato) che ne ha illustrato i contenuti ed evidenziato le importanti possibili applicazioni diagnostiche future.

Quantification of Free Circulating DNA As a Diagnostic Marker in Lung Cancer

Gabriella Sozzi, Davide Conte, MariaElena Leon, Rosalia Cirincione, Luca Roz, Cathy Ratcliffe, Elena Roz, Nicola Cirenei, Massimo Bellomi, Giuseppe Pelosi, Marco A. Pierotti, and Ugo Pastorino
JCO Nov 1 2003: 3902-3908.

Early Detection of Lung Cancer Using Serum RNA or DNA Markers: Ready for Prime Time[®] or for Validation?

Paul A. Bunn, Jr
JCO Nov 1 2003: 3891-3893.