



**SAPIENZA  
UNIVERSITA' DI ROMA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE  
XXVIII CICLO**

*πάντα ρεῖ ὡς ποταμός*

*(panta rei os potamòs)*

*Eraclito, (91 Diels-Kranz)*

**Razionale per la biopsia liquida nel carcinoma del colon-retto:  
focus sulle cellule tumorali circolanti**

**Relatore**

Prof. Paola Gazzaniga

**Dottorando**

Dott.ssa Chiara Nicolazzo

**Anno Accademico 2014-2015**

*Ai miei genitori...*

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	4
<b>1.1 ETEROGENEITA' INTRATUMORALE E BIOPSIA LIQUIDA</b>	4
1.1.1 Carcinoma metastatico del colon-retto: una malattia in continua evoluzione	4
1.1.2 Eterogeneità tumorale	10
1.1.3 La biopsia liquida	13
<b>1.2 BIOLOGIA DELLE CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI</b>	20
1.2.1 Transizione epitelio-mesenchimale	20
1.2.2 Il razionale della biopsia liquida nel carcinoma del colon-retto	24
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	26
2.1 Enumerazione di cellule tumorali circolanti: CellSearch <sup>®</sup>	26
2.2 Isolamento e caratterizzazione di cellule tumorali circolanti: AdnaTest	28
2.3 Isolamento di cellule tumorali circolanti: ScreenCell <sup>®</sup>	30
2.3.1 ScreenCell <sup>®</sup> Cyto Kit	31
2.3.2 ScreenCell <sup>®</sup> MB Kit	32
2.4 Estrazione di RNA e RT-PCR sulle cellule tumorali circolanti	33
2.5 Anticorpi	34
2.6 Analisi delle CTC in immunofluorescenza	34
2.6.1 Esperimenti di doppia marcatura	35
2.6.2 Esperimenti di tripla marcatura	35
2.7 Stato mutazionale di <i>KRAS</i> in campioni di tessuto	36
2.8 Stato mutazionale e sovraespressione di <i>KRAS</i> in CTC	37
<b>3. RISULTATI</b>	38
<b>3.1 CTC NEL CARCINOMA METASTATICO DEL COLON-RETTO: ISOLAMENTO CON METODI EpCAM-DIPENDENTI</b>	38
3.1.1 Enumerazione delle cellule tumorali circolanti in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto	38
3.1.1.a Disegno dello studio	38
3.1.1.b Significato prognostico della conta delle CTC in pazienti con mCRC	38
3.1.1.c Significato predittivo delle CTC in pazienti affetti da mCRC	39

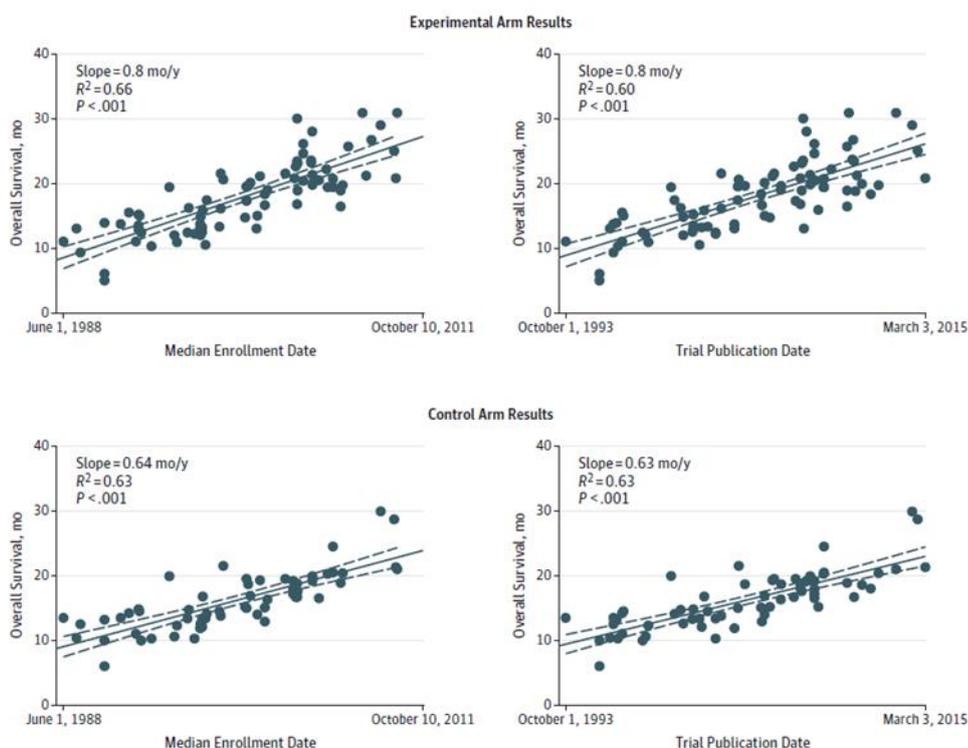
<b>3.1.1.d</b>	Significato prognostico e predittivo delle CTC in pazienti affetti da mCRC in terapia con bevacizumab	40
<b>3.1.2</b>	Isolamento di cellule tumorali circolanti in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto: CellSearch <sup>®</sup> ed AdnaTest a confronto	41
<b>3.1.3</b>	Caratterizzazione di cellule tumorali circolanti in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto: stato mutazionale di <i>KRAS</i>	41
<b>3.2</b>	<b>CTC NEL CARCINOMA METASTATICO DEL COLON-RETTO: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE CON METODO EPCAM-INDIPENDENTE</b>	42
<b>3.2.1</b>	Caratterizzazione in immunofluorescenza di cellule tumorali circolanti in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto: espressione di EpCAM rispetto alla sua frazione extracellulare	42
<b>3.2.2</b>	Caratterizzazione molecolare di cellule tumorali circolanti in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto: identificazione del fenotipo ibrido epitelio-mesenchimale	43
<b>3.2.3</b>	Caratterizzazione molecolare di cellule tumorali circolanti in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto: espressione di marcatore di staminalità su CTC a fenotipo ibrido epitelio/mesenchimale	45
<b>3.2.4</b>	Caratterizzazione molecolare di cellule tumorali circolanti in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto: HIF-1 e fenotipo ibrido epitelio-mesenchimale	46
<b>3.2.5</b>	Isolamento e caratterizzazione di cluster di CTC da pazienti con carcinoma del colon retto: risultati preliminari	47
<b>3.2.6</b>	Caratterizzazione molecolare di cellule tumorali circolanti in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto: marcatori di farmaco resistenza	48
<b>4.</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	51
<b>5.</b>	<b>ABBREVIAZIONI</b>	59
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	61

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. ETEROGENEITA' INTRATUMORALE E BIOPSIA LIQUIDA

### 1.1.1 Carcinoma metastatico del colon-retto: una malattia in continua evoluzione

Nelle ultime due decadi è stato ottenuto un significativo miglioramento della sopravvivenza dei pazienti affetti da carcinoma metastatico del colon-retto (Fig. 1). La sopravvivenza globale dei pazienti con carcinoma metastatico non-resecabile del colon-retto è infatti passata dai 12 mesi nell'era della monoterapia con fluoropirimidine ai 30 mesi nell'epoca attuale delle terapie di combinazione tra farmaci citotossici e terapie a bersaglio molecolare. La riduzione costante del tasso di mortalità per cancro del colon-retto negli ultimi venti anni è in larga parte ascrivibile al miglioramento delle conoscenze sulla biologia della malattia e al successivo sviluppo di terapie a bersaglio molecolare, entrate ormai a far parte degli standard di cura per la malattia metastatica. Per tali ragioni, il cancro del colon-retto è spesso preso ad esempio per dimostrare il valore del progresso graduale e costante in oncologia, dove i maggiori risultati sono ottenuti attraverso una serie di piccoli successi.



**Fig.1** Graduale incremento della sopravvivenza globale dei pazienti affetti da carcinoma metastatico del colon-retto nelle ultime due decadi.

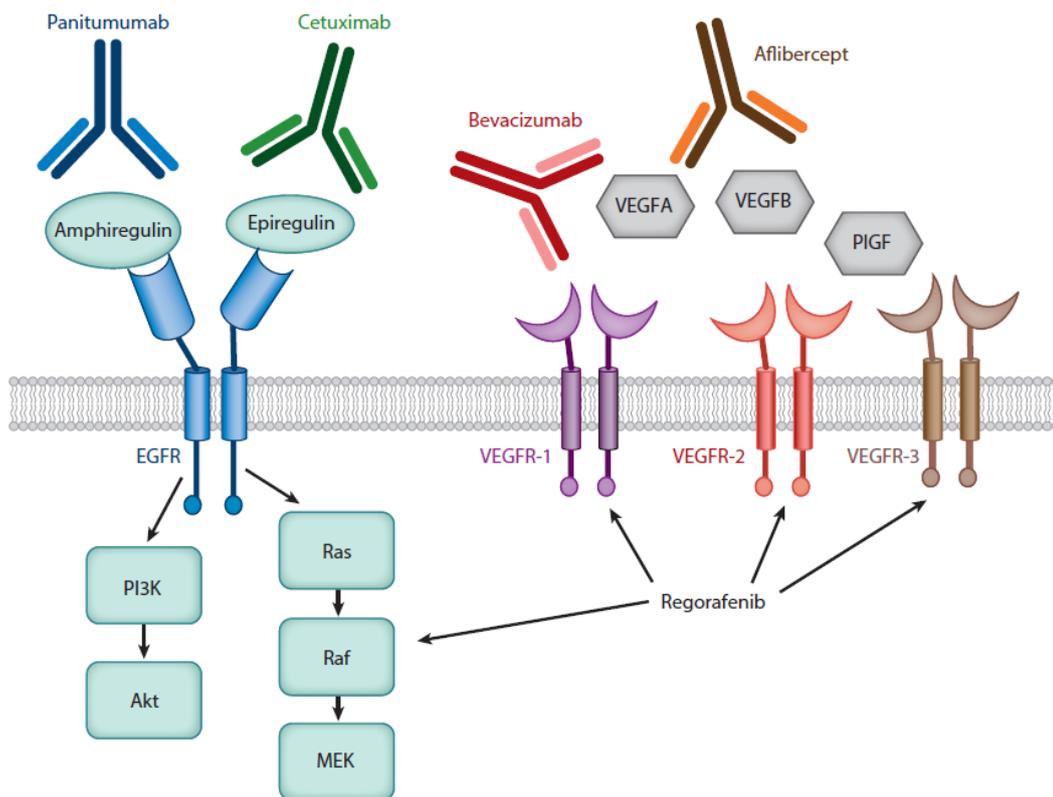
I progressi compiuti nella gestione del carcinoma metastatico del colon-retto sono stati ottenuti grazie alla conduzione di studi clinici rigorosi, in cui migliaia di pazienti sono stati arruolati e per i quali un significativo numero di ricercatori ha profuso un considerevole impegno. Il massiccio arruolamento di pazienti in studi clinici sperimentali ha parallelamente condotto all'elaborazione di nuovi paradigmi, dalla diversificazione della malattia in sottotipi biologicamente distinti, alla identificazione di eventi molecolari chiave per la progressione tumorale [1]. Un ulteriore miglioramento della prognosi dei pazienti affetti da carcinoma metastatico del colon-retto potrà dipendere da una più accurata selezione dei pazienti candidati a specifiche terapie e dall'identificazione di nuove vie di segnale e di nuovi meccanismi di resistenza ai farmaci. L'elucidazione dei meccanismi di resistenza innata e acquisita ai farmaci a bersaglio molecolare, infatti, risulta essenziale per il disegno e lo sviluppo di nuove terapie di combinazione. D'altro canto, l'eterogeneità molecolare del carcinoma del colon-retto incide considerevolmente sul futuro sviluppo dei farmaci antitumorali e la recente classificazione in sottotipi molecolari del cancro del colon-retto di fatto espande le possibilità che nuovi geni chiave nei processi di cancerogenesi e di progressione tumorale diventino bersaglio di nuove terapie [2]. L'approccio terapeutico attuale per il trattamento del carcinoma metastatico non-resecabile del colon-retto si basa sull'uso di terapie di combinazione, che prevedono l'associazione di chemioterapici citotossici come fluorouracile, oxaliplatino e irinotecan e di terapie a bersaglio molecolare (Fig. 2). L'approvazione nelle ultime due decadi di farmaci antiangiogenici e di anticorpi monoclonali diretti contro il recettore di crescita epidermico (epidermal growth factor receptor, EGFR) ha, da un lato, ampliato le opzioni terapeutiche in questo setting di malattia e, dall'altro, complicato considerevolmente la decisione clinica sulla strategia terapeutica più appropriata [3].

Therapeutic agent	Mechanism of action
5-Fluorouracil	Pyrimidine analog
Oxaliplatin	Platinum derivative, alkylating agent
Irinotecan	Topoisomerase I inhibitor
Regorafenib	Tyrosine kinase inhibitor of VEGFR1–3, TIE2, others
Bevacizumab	Monoclonal antibody to VEGF-A
Aflibercept	Recombinant protein, decoy receptor for VEGF-A, VEGF-B, and PlGF
Cetuximab	Monoclonal antibody to EGFR
Panitumumab	Monoclonal antibody to EGFR

Abbreviations: EGFR, epidermal growth factor receptor, FDA, US Food and Drug Administration; TIE2, tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domain 2; VEGF, vascular endothelial growth factor.

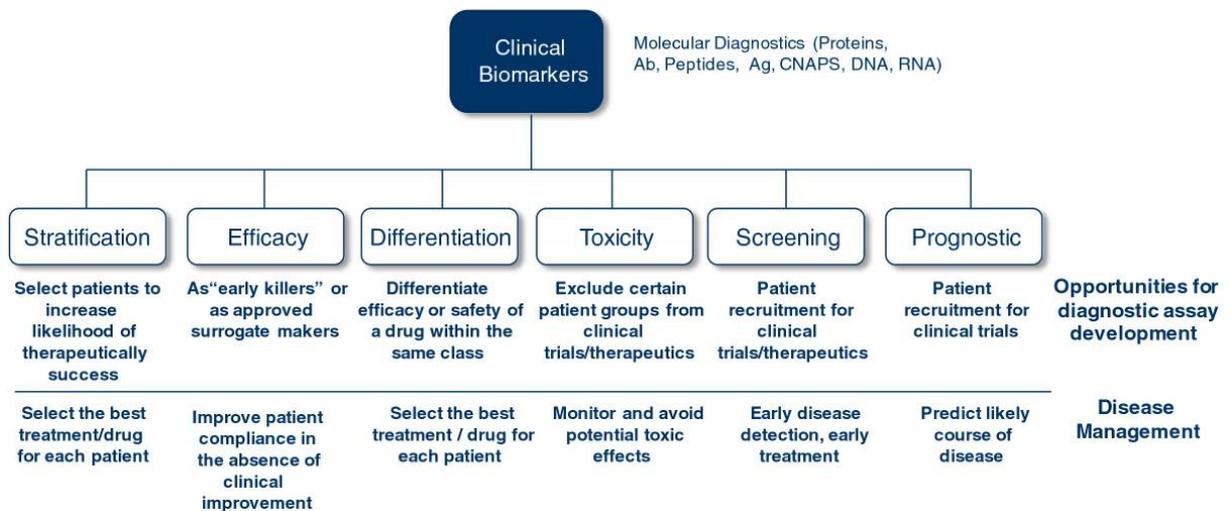
**Fig.2** Scenario terapeutico attuale nel trattamento del carcinoma metastatico del colon-retto: farmaci citotossici e terapie a bersaglio molecolare.

Il ruolo preciso dei farmaci biologici nella diverse linee di terapia per carcinoma metastatico del colon-retto non è ancora stato completamente definito, sebbene larga parte degli studi clinici e della ricerca di base venga di fatto indirizzata verso questo fine. In prima linea, l'efficacia di bevacizumab, anticorpo monoclonale diretto contro il fattore di crescita vascolare-A (vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A), e di cetuximab e panitumumab, entrambi anticorpi monoclonali anti-EGFR, indicati in assenza di mutazioni del gene *RAS*, hanno dimostrato una chiara efficacia in combinazione con chemioterapia. Nelle linee di trattamento successive alla prima, oltre al bevacizumab, altri due farmaci antiangiogenici hanno dimostrato un vantaggio in sopravvivenza globale: aflibercept, proteina ricombinante diretta contro VEGF-A, VEGF-B e fattore di crescita placentare (placental growth factor, PIGF) e regorafenib, inibitore tirosin-chinasico dei recettori per il VEGF (vascular endothelial growth factor receptors 1, 2 e 3, VEGFR 1, 2 e 3) (Fig. 3).



**Fig. 3** Terapie a bersaglio molecolare in uso per il trattamento di pazienti affetti da carcinoma metastatico del colon-retto. Farmaci biologici e inibizione delle vie di segnalazione intracellulare.

L'ulteriore miglioramento della prognosi dei pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto, sebbene possibile, è ostacolato dall'inaccuratezza dei biomarcatori predittivi di risposta alla terapia, di cui attualmente disponiamo [4]. L'incapacità di discriminare a priori i pazienti che beneficeranno del trattamento si ripercuote di fatto sull'efficacia globale delle terapie a bersaglio molecolare e tradisce l'intento con il quale questi farmaci sono stati ideati, ossia quello di individualizzare la scelta terapeutica sulla base delle caratteristiche della malattia di ciascun paziente. L'individuazione di biomarcatori in grado di definire chiaramente quale sottogruppo di pazienti possa più verosimilmente rispondere ad un dato trattamento appare pertanto necessaria per un utilizzo mirato del farmaco, che risulta di eguale importanza per la prognosi globale dei pazienti e per la sostenibilità dei costi, quanto mai elevati, delle nuove terapie. I biomarcatori (Fig. 4), infatti, sono sempre più frequentemente integrati nei programmi di sviluppo di nuovi farmaci, dalla fase di identificazione del bersaglio molecolare a quella della sperimentazione clinica [5, 6]. Un simile scenario è il risultato dell'ampliamento delle conoscenze sulla biologia dei tumori e dello sviluppo concomitante di un numero crescente di nuovi farmaci a bersaglio molecolare.



**Fig. 4** Biomarcatori clinici: categorie e tipi.

Il carcinoma del colon-retto, nella storia recente dell'oncologia, rappresenta un caso paradigmatico, esemplificativo tanto del successo quanto del fallimento del processo di qualificazione, verifica e validazione di biomarcatori predittivi [7]. Nel 2006 fu pubblicato il primo studio clinico retrospettivo sulla correlazione tra mutazione del gene *KRAS* e resistenza alla terapia con anticorpi monoclonali anti-EGFR. Lo studio fu condotto su appena 30 pazienti affetti da carcinoma metastatico del colon-retto trattati con cetuximab e dimostrò che,

nei pazienti con la mutazione attivante (Gly12Val, esone 2) di *KRAS*, il tasso di risposta al cetuximab era dello 0% e la sopravvivenza globale significativamente inferiore rispetto ai pazienti trattati con *KRAS* wild-type. Gli studi clinici successivi hanno consolidato il significato clinico della mutazione di *KRAS*, attribuendo allo stato mutazionale del gene la capacità di discriminare in larga parte i pazienti sensibili alla terapia con inibitori di EGFR rispetto a quelli resistenti. In risposta alle crescenti evidenze offerte dalla letteratura scientifica internazionale in merito al chiaro significato predittivo dello stato di *KRAS*, la Food and Drug Administration (FDA), nel 2009, ha ristretto l'uso degli inibitori di EGFR in pazienti con *KRAS* wild-type. La successiva rapida evoluzione delle conoscenze sulla via di segnalazione *KRAS*-dipendente ha portato alla necessità di estendere l'analisi mutazionale agli esoni 3 e 4 di *KRAS* e agli esoni 2, 3 e 4 di *NRAS*. Nel tentativo di chiarire ulteriori possibili meccanismi molecolari di resistenza agli inibitori di EGFR, l'attenzione dei ricercatori è attualmente puntata sulla definizione delle alterazioni geniche nei pazienti che, seppure *RAS* wild-type, non rispondono alla terapia. Nuovi biomarcatori, come BRAF, PIK3CA, PTEN, epiregulina, amphiregulina e mutazioni di *RAS* a bassa frequenza sono stati inclusi nel novero dei possibili biomarcatori predittivi di risposta ai farmaci anti-EGFR e sono tuttora in corso di validazione [8]. Se la storia di *KRAS* insegna come discriminare chi può essere efficacemente trattato con anticorpi monoclonali anti-EGFR, la definizione di biomarcatori predittivi di risposta alle terapie antiangiogeniche dimostra che concetto di terapia a bersaglio molecolare non si sovrappone necessariamente a quello di personalizzazione delle cure. Sebbene, infatti, le terapie biologiche dirette contro il VEGF siano ad oggi approvate con molteplici indicazioni per il trattamento di pazienti con malattia in fase avanzata, la definizione di biomarcatori predittivi di risposta verso questi farmaci rimane ancora vaga. Il presupposto teorico per cui le terapie antiangiogeniche, non essendo dirette contro la cellula tumorale, possono avere un'applicazione indipendentemente dal profilo molecolare del singolo tumore, si è tradotto negli anni in un uso indiscriminato dei farmaci anti-VEGF in tutti i pazienti con malattia metastatica per i quali i suddetti farmaci sono stati approvati. L'assenza di biomarcatori per la selezione a priori di pazienti sensibili alla terapia antiangiogenica ha di fatto limitato l'efficacia globale di tale strategia terapeutica e, nonostante i considerevoli benefici dimostrati in numerosi studi clinici di fase III, ha pregiudicato l'approvazione di bevacizumab nel setting adiuvante e determinato il fallimento degli inibitori di tirosin-chinasi in diversi tumori solidi. La ricerca traslazionale degli ultimi dieci anni ha portato all'identificazione di molti possibili biomarcatori predittivi di risposta alle terapie antiangiogeniche, senza però condurre alla validazione di alcuno di essi. La

ricerca di nuovi marcatori per la selezione a priori di pazienti candidati a terapia anti-VEGF resta pertanto ancora aperta e il suo successo consentirà di individuare a priori chi beneficerà del trattamento e di elaborare strategie terapeutiche alternative per i pazienti resistenti alla terapia [9].

### **1.1.2 Eterogeneità tumorale**

È ormai noto che un numero ristretto di geni regola le diverse fasi della progressione tumorale, attraverso l'acquisizione di mutazioni o attraverso l'alterazione della regolazione epigenetica. Il quadro biologico è reso estremamente complesso dalla varietà di modi in cui mutazioni distinte possono combinarsi, tra loro e ad assetti normali, nel dare origine a tumori differenti, allo stesso tipo di tumore in pazienti diversi e a cellule eterogenee all'interno della medesima massa tumorale [10]. Per decenni, l'acquisizione progressiva di mutazioni a livello delle cellule somatiche ha rappresentato il fondamento del modello sperimentale classico di progressione tumorale, secondo il quale le cellule evolvono da uno stato normale ad uno maligno passando attraverso fasi intermedie.

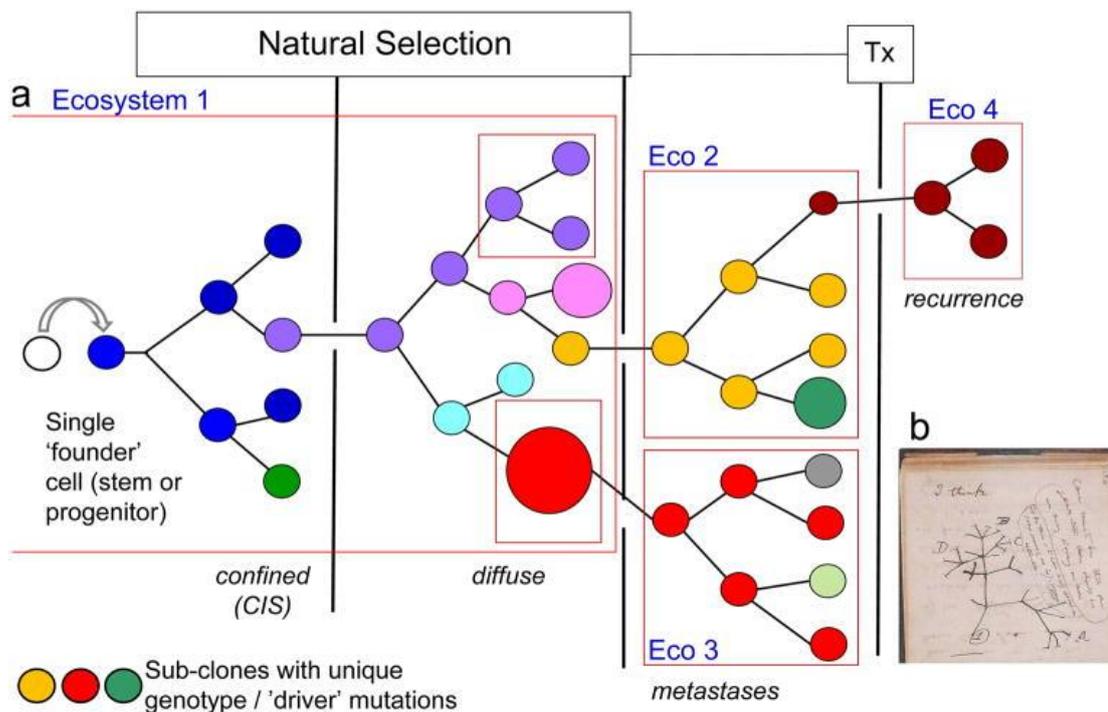
Si possono individuare due fasi distinte nell'evoluzione del cancro:

1. la trasformazione neoplastica, il cui primo evento (iniziazione) è una mutazione o una alterazione epigenetica che permette ad una sottopopolazione di cellule di eludere i meccanismi di controllo della divisione cellulare e quindi di proliferare in modo incontrollato;
2. la progressione tumorale, nel corso della quale, attraverso l'accumularsi di una serie di alterazioni genetiche ed epigenetiche, le cellule tumorali si diversificano progressivamente e si selezionano mediante un processo di competizione tra i vari cloni. Con il progredire della malattia, è possibile che non si ritrovi più la mutazione iniziale, perché il clone primario può essersi "estinto" per effetto della competizione con cloni più aggressivi che hanno preso il sopravvento o per cambiamenti avvenuti nel microambiente, in cui si sono create condizioni non permissive per la sua sopravvivenza [11].

Secondo il modello dell'evoluzione clonale (Fig. 5a), i tumori si sviluppano da una sola cellula iniziale, la cui progenie attraversa una successione di eventi, che non avvengono rigidamente secondo un ordine predefinito [12, 13]. La dinamica è quella di un alternarsi di fasi di diversificazione e di selezione di sottopopolazioni con nuove caratteristiche, legate in parte ad un aumento dell'attività proliferativa e alla capacità di sfuggire ai meccanismi di controllo della divisione cellulare. Forse uno dei modelli più documentati che sostengono l'ipotesi dell'evoluzione clonale è quello del cancro del colon. Il modello prevede che

ciascuna espansione clonale sia accompagnata da un determinato evento genetico, che sia un'alterazione di specifici geni o una variazione dell'assetto cromosomico, che correla con un preciso cambiamento morfologico che interessa la mucosa del colon [14].

Secondo la teoria dell'evoluzione darwiniana del cancro (Fig. 5b), nello stesso tumore coesistono decine o centinaia di popolazioni cellulari diverse in competizione tra loro, soggette ad un continuo processo di variabilità genetica che ha come obiettivo l'acquisizione di un vantaggio selettivo rispetto ai coesistenti cloni cellulari. Come nel caso dell'evoluzione delle specie, il processo è stocastico ed è per questo che non può essere visto come una sequenza rigorosamente lineare di cambiamenti genetici ed epigenetici, che coincidono con i passaggi che segnano il progressivo allontanamento dal fenotipo normale verso quello tumorale, fino all'acquisizione di invasività e competenza metastatica [15].



**Fig.5** Architettura ramificata del processo di evoluzione molecolare del cancro. **a.** Pattern rappresentativo dell'evoluzione dei tumori solidi come originariamente descritto da Nowell (1976). **b.** Appunti sulla teoria darwiniana dell'evoluzione delle specie (1837).

Le implicazioni cliniche di una tale eterogeneità sono estremamente rilevanti. Infatti, tumori apparentemente simili per caratteristiche morfologiche, e per questo trattati alla stessa maniera, possono in realtà rivelarsi entità dissimili da un punto di vista molecolare, rispondere

in modo differente alle terapie e avere esiti diversi. Per la personalizzazione delle cure, quindi, lo studio del profilo genetico delle cellule tumorali è un elemento essenziale [16].

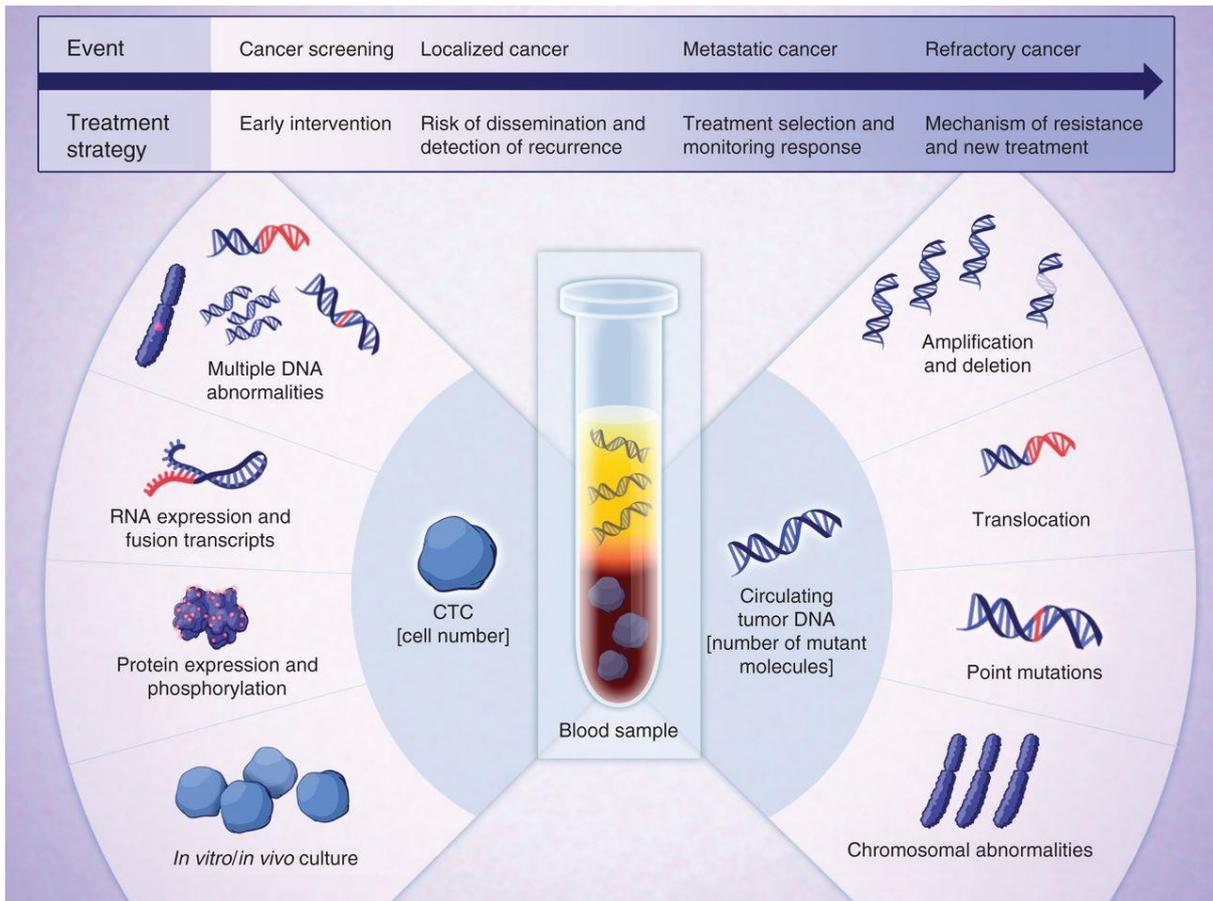
La caratterizzazione del genotipo tumorale, attraverso l'analisi di tessuto ottenuto da tumori primitivi o da lesioni secondarie, è ormai entrata di diritto nella pratica clinica in oncologia. D'altro canto, però, parallelamente alla definizione dei meccanismi di iniziazione, mantenimento e progressione tumorale attraverso lo studio dettagliato del genoma del cancro, aumentano le difficoltà legate all'identificazione degli eventi molecolari determinanti e alla classificazione di bersagli molecolari rilevanti dal punto di vista clinico. Il perfezionamento delle tecniche di caratterizzazione molecolare del cancro, inoltre ha rivoluzionato anche il modo in cui gli studi clinici vengono disegnati e i criteri di selezione con cui i pazienti vengono arruolati [17, 18]. Parallelamente, le probabilità che un nuovo farmaco riceva l'approvazione da parte delle autorità competenti sulla sola base della diagnosi istopatologica, diminuiscono progressivamente. La gran parte dei farmaci approvati in oncologia negli ultimi anni, infatti, prevede l'uso di biomarcatori molecolari predittivi per la selezione dei pazienti candidati alla terapia. E' nata così una nuova generazione di studi clinici "biomarker-driven", a conferma della rilevanza della genomica tumorale e dell'importanza della variabilità tra pazienti affetti dalla stessa patologia per la personalizzazione delle cure [19]. Nonostante la variabilità tra pazienti sia ormai chiaramente riconosciuta, restano i limiti dei nuovi studi clinici per la comprensione dell'eterogeneità intratumorale nello stesso individuo. I nuovi studi clinici, basati sull'analisi di specifici biomarcatori, prevedono la caratterizzazione molecolare di un campione di tessuto tumorale prelevato da una precisa regione della massa tumorale in un determinato momento della storia naturale della malattia. La dinamica delle alterazioni geniche a carico delle cellule tumorali, riconosciuta dal modello darwiniano dell'evoluzione del cancro ed esacerbata dalla pressione selettiva esercitata dalle terapie, sfugge all'analisi puntuale di una porzione della neoplasia, non rappresentativa del suo insieme. La valutazione di regioni diverse di una stessa massa tumorale e la caratterizzazione molecolare di campioni prelevati in momenti diversi della storia clinica della malattia potrebbero offrire un'immagine più attendibile del profilo molecolare del tumore, ma sfortunatamente non sono parte del percorso diagnostico nella pratica clinica né nel contesto dei nuovi studi clinici "biomarker-driven". Al fine di compiere passi in avanti significativi verso l'individualizzazione delle cure, il disegno degli studi clinici dovrebbe ulteriormente essere rielaborato, tenendo conto dell'eterogeneità intratumorale nel singolo individuo [20]. Un approccio innovativo, che sta

rapidamente guadagnando consensi nella comunità scientifica, è quello che prevede una prima caratterizzazione molecolare del tessuto tumorale, al momento della diagnosi, e successive rivalutazioni ravvicinate nel tempo, a mezzo di biopsia liquida, ovvero tramite analisi molecolare del profilo genico di cellule tumorali circolanti (CTC) o DNA tumorale circolante (ctDNA) [14].

### **1.1.3 La biopsia liquida**

Benché altamente informativa, l'analisi del tessuto tumorale presenta notevoli limitazioni legate al concetto di eterogeneità tumorale. Infatti, essa rappresenta l'immagine statica e parziale di una popolazione di cellule in continua trasformazione e non fornisce, pertanto, informazioni rappresentative dell'intera massa tumorale né dell'evoluzione nel tempo della malattia. Dal punto di vista teorico, una caratterizzazione affidabile ed esaustiva del genotipo tumorale dovrebbe consentire di analizzare il profilo genetico delle cellule tumorali, seguirne l'evoluzione durante il corso della malattia, nelle sue diverse fasi e in seguito ai trattamenti e capire come il profilo genetico del tumore possa influenzare la risposta del singolo paziente ai trattamenti farmacologici per guidare di conseguenza la scelta delle terapie. Quanto detto rappresenta un obiettivo piuttosto lontano se lo strumento di cui ci si avvale è l'analisi del tessuto tumorale ottenuto da biopsia che, come procedura invasiva e non scevra da rischi per il paziente, risulta difficilmente ripetibile con la frequenza che un monitoraggio "in tempo reale" del genotipo tumorale richiederebbe. Su questi presupposti teorici, è stata elaborata negli ultimi decenni l'idea che l'analisi di cellule tumorali circolanti presenti nel sangue periferico di pazienti affetti da neoplasie potesse rappresentare un surrogato del più tradizionale studio del tessuto tumorale [21]. Attraverso solide evidenze scientifiche guadagnate nel tempo, la biopsia liquida, ovvero ottenuta da prelievo di sangue periferico, si è affermata come procedura affidabile, facilmente ripetibile e fonte di preziose informazioni sulla biologia dei tumori. Nel sangue venoso periferico di pazienti sono presenti cellule tumorali circolanti e DNA tumorale circolante, entrambi rilasciati dal tumore primitivo o dalle metastasi da esso derivate (Fig. 6).

I notevoli progressi tecnologici compiuti negli ultimi decenni hanno reso accessibili cellule tumorali circolanti e DNA tumorale circolante, benché presenti in minime quantità nel sangue venoso periferico di pazienti affetti da neoplasie [22, 23]. Da un punto di vista metodologico, sistemi sofisticati e altamente sensibili consentono oggi di identificare cellule tumorali



**Fig. 6** Applicazioni dell'analisi di ctDNA e di CTC a confronto.

circolanti tra migliaia di cellule presenti nel sangue e, successivamente, attraverso tecniche di Whole Genome Amplification (WGA) e di Next Generation Sequencing (NGS), di caratterizzare il profilo genico delle cellule isolate [24]. Di contro, il DNA tumorale circolante può essere ottenuto con metodiche più semplici, ma inevitabilmente meno specifiche rispetto ai sistemi di isolamento delle cellule tumorali circolanti. Entrambi i suddetti approcci hanno recentemente guadagnato l'attenzione di numerosi gruppi di ricerca nel panorama internazionale e sono attualmente oggetto di investigazione come biomarcatori prognostici e predittivi in ambito oncologico. L'evoluzione naturale della biopsia liquida in oncologia è strettamente legata al moltiplicarsi di sistemi via via più sofisticati che consentano, con un flusso di lavoro unico e continuo, l'isolamento di cellule tumorali circolanti o di DNA tumorale circolante e il successivo sequenziamento del genoma tumorale, in modo da minimizzare la variabilità legata alla procedura e da aumentare le possibilità che la biopsia liquida possa essere qualificata e validata come biomarcatore. Le possibili applicazioni cliniche della biopsia liquida dipendono essenzialmente dal tipo di approccio utilizzato per lo studio delle cellule tumorali circolanti o del DNA tumorale circolante [25]. L'approccio

quantitativo, infatti, può offrire informazioni prognostiche, utili per inquadrare il possibile decorso clinico della malattia [26]. Dall'altra parte, l'approccio qualitativo, mirato alla caratterizzazione molecolare delle cellule tumorali circolanti o del DNA tumorale circolante, può essere utilizzato per l'analisi di mutazioni predittive di risposta alle terapie o per monitorare in tempo reale l'evoluzione clonale della neoplasia al fine di consentire un adattamento tempestivo della strategia terapeutica [27]. In ogni caso, perché la biopsia liquida possa guadagnare un suo proprio spazio nella pratica clinica quotidiana in oncologia, è necessaria la dimostrazione della validità analitica e clinica dei sistemi di isolamento e caratterizzazione delle cellule tumorali circolanti e del DNA tumorale circolante. Per le ragioni suddette, i risultati dei numerosi studi clinici prospettici in corso per dimostrare l'utilità clinica della biopsia liquida sono attesi con fiducia dalla comunità scientifica.

Poiché le cellule tumorali apoptotiche o in necrosi liberano frammenti di DNA nel torrente ematico, e questo DNA correla con lo stadio del tumore e con la prognosi, la biopsia liquida intesa come ctDNA può rappresentare una fonte di DNA ottimale, in grado di offrire le medesime informazioni del DNA tissutale, comprendendo il profilo genetico sia della lesione primaria, sia delle metastasi [28]. In un primo tempo questa tecnica è stata limitata dal fatto che il DNA circolante non fosse unicamente di origine tumorale e quindi l'identificazione di alleli tumorali fosse complessa: con il miglioramento della sensibilità e dell'accuratezza delle tecniche di sequenziamento, anche la biopsia liquida si è perfezionata e ha reso possibile l'individuazione delle aberrazioni genetiche ed epigenetiche. La biopsia liquida attualmente offre un elevato grado di specificità: questo significa che è in grado di fornire dati robusti e riproducibili in modo semplice e non invasivo. Ciò è stato dimostrato anche da studi recenti sul carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) che hanno valutato lo stato mutazionale di *EGFR*, da cui emergono, nel confronto tra DNA circolante e DNA tissutale, una concordanza del 93,4%, una specificità del 99,8% e una sensibilità del 65,7% [29]. Potrebbe essere utilizzata per una varietà di applicazioni cliniche e sperimentali precedentemente impossibili: il monitoraggio di una serie di genotipi tumorali, che sono instabili e, sotto pressione selettiva, soggetti a cambiamenti, sta diventando sempre più plausibile. La biopsia liquida, inoltre, potrebbe fornire nuove intuizioni biologiche nel processo di metastasi e chiarire vie di segnalazione coinvolte nei processi di invasività cellulare e nella capacità di dare metastasi. La biopsia liquida può trovare grande utilità anche nella target therapy: consente, per esempio, il monitoraggio della presenza di cloni di

resistenza ai farmaci, come nel caso della terapia anti-EGFR. Ulteriori potenziali applicazioni della biopsia liquida potrebbero essere lo screening precoce delle neoplasie maligne e la diagnosi della malattia minima residua. Infine, la biopsia liquida può divenire fondamentale come biomarcatore non invasivo per lo sviluppo di strategie di gestione del tumore personalizzate sul singolo paziente. Recentemente, infatti, lo studio del DNA circolante ha trovato enorme applicazione clinica in pazienti con carcinoma del colon-retto in trattamento con farmaci a bersaglio molecolare indirizzati contro il recettore per il fattore di crescita epidermico [30]. In questi tumori, come in molti altri, EGFR è responsabile dell'accensione di cascate di segnali che spingono le cellule maligne alla proliferazione incontrollata, a indurre la formazione di vasi dedicati alle esigenze tumorali e a invadere altri organi e tessuti. Bloccarlo significa spegnere tutto questo, ma poiché esso rappresenta solo uno degli ingranaggi del complesso meccanismo da cui dipendono le proprietà maligne di questi tumori, altri elementi a valle, se opportunamente attivati, potrebbero permettere di aggirare una sua eventuale inattivazione, annullando così i benefici del trattamento. La stessa via di segnalazione, quindi, in pazienti diversi, ma anche in cellule tumorali differenti appartenenti allo stesso paziente, potrebbe mediare la sensibilità del tumore al farmaco o la sua capacità di resistergli. Molto di quello che oggi si sa su sensibilità e resistenze (primarie e acquisite durante il trattamento) dei tumori metastatici colon-rettali ai farmaci antagonisti dell'EGFR si deve agli studi condotti da Alberto Bardelli e dalla sua équipe [31, 32]. Molto ancora, però, rimane da indagare per sviluppare strategie che permettano di superare gli ostacoli che incontrano le terapie a bersaglio molecolare e ottimizzare i trattamenti. Il fine ultimo di questi studi è quello di fornire strumenti efficaci per distinguere meglio e prima i diversi tumori solidi, in primis quelli del colon-retto, e determinare in base alle differenze genetiche la giusta sequenza o combinazione di terapie da utilizzare per progettare un attacco multiplo a più bersagli, che superi le limitazioni di una singola strategia terapeutica. L'impiego di modelli cellulari di cancro che ripropongono gli stessi tratti molecolari mostrati nell'organismo dai tumori di interesse permettono di studiare in dettaglio diversi aspetti della biologia tumorale, come i segnali che spingono la proliferazione incontrollata, e di valutare in questi contesti l'efficacia di diverse terapie anticancro.

I profili genetici e molecolari dei pazienti, invece, vengono ricostruiti impiegando alcune tra le più avanzate tecnologie per lo studio dei genomi, in particolare la metodica di sequenziamento del DNA di ultimissima generazione che permette di sequenziare l'intero

genoma in brevissimo tempo. Fino a qualche tempo fa era possibile condurre questo genere di studi solo su campioni di tessuto malato prelevati dal paziente utilizzando metodi invasivi come la biopsia. Gli studi degli ultimi anni di Bardelli sono invece stati mirati allo stesso tipo di informazioni da un semplice prelievo di sangue, analizzando i frammenti di DNA che vengono rilasciati dal tumore nel circolo sanguigno. In questo modo è possibile monitorare più facilmente ed efficacemente l'evoluzione dei profili genetici delle cellule maligne e della malattia in seguito ai trattamenti, come dimostrato dallo scienziato nel caso dei tumori colon-rettali. Fino a qualche anno fa i pazienti con metastasi di questo tumore venivano trattati con farmaci mirati contro EGFR e solo un 10-20% di essi ne beneficiava. Oggi sappiamo che questo accade perché, nella maggior parte dei tumori del colon, sono presenti alterazioni molecolari (le più frequenti delle quali sono le mutazioni in *KRAS* e *BRAF*) che impediscono la risposta alle terapie anti-EGFR [33]. Applicando queste conoscenze alla pratica clinica, i pazienti vengono ora selezionati in base ad almeno uno di questi parametri, ottenuti mediante analisi del tessuto tumorale primitivo e, quando disponibile, del tessuto metastatico. Dagli studi di Bardelli e coll emerge altresì che la comparsa di resistenza alla terapia a bersaglio molecolare può essere determinata, con modalità rapida e non invasiva, attraverso un semplice prelievo di sangue. L'identificazione di mutazioni di *KRAS* nel DNA circolante di pazienti con carcinoma del colon-retto in trattamento con terapie anti-EGFR è infatti predittiva di recidiva di malattia con una anticipazione diagnostica notevole rispetto alle metodiche di imaging tradizionale. L'analisi del ctDNA prima e dopo il trattamento è pertanto in grado di fornire un quadro globale della genetica molecolare del singolo tumore, incluse le modifiche del profilo mutazionale che possono sopraggiungere nel corso della malattia, e l'eterogeneità che può emergere come risultato della pressione selettiva della terapia stessa. Certamente la comprensione dei meccanismi di resistenza acquisita ai farmaci a bersaglio molecolare può essere utilizzata allo scopo di pianificare trattamenti combinati con farmaci capaci di eradicare i cloni resistenti, responsabili del fallimento terapeutico e della progressione di malattia. Il vantaggio della biopsia liquida a tale scopo è la possibilità di ottenere queste informazioni prima della manifestazione clinica della recidiva.

Oltre al suo ruolo come biomarcatore predittivo, il ctDNA è stato utilizzato per lo screening di mutazioni somatiche, e pertanto come biomarcatore diagnostico. Nel 2014, un team di ricercatori [34] hanno analizzato 187 pazienti oncologici per la ricerca di almeno una mutazione somatica. Per fare questo, hanno usato un approccio progressivo per ogni paziente,

iniziando dal sequenziamento di diversi geni comunemente mutati nei tumori e, in caso di assenza di tali mutazioni, proseguendo con il sequenziamento delle regioni codificanti dell'intero genoma. In un secondo momento i ricercatori hanno analizzato il ctDNA per la specifica mutazione trovata nel tumore, ritrovandola in circolo nell'82% dei casi, e correlata con lo stadio di malattia. Mentre solo il 47% dei pazienti con tumori di stadio I avevano ctDNA, le percentuali nei pazienti con tumori di stadio II, III e IV erano rispettivamente del 55, 69 e 82%. Inoltre la concentrazione, quindi la quantità del ctDNA era enormemente più elevata nei pazienti con neoplasie avanzate, suggerendo che misurare i livelli di ctDNA nel plasma potrebbe essere utile in futuro per determinare quanto un tumore sia avanzato alla diagnosi. Il ctDNA era frequentemente presente nei pazienti che non avevano concentrazioni rilevabili di cellule tumorali circolanti, suggerendo che questi due biomarcatori siano entità distinte. In un gruppo separato di 206 pazienti con tumori metastatici del colon-retto, gli autori hanno mostrato che la sensibilità della determinazione di ctDNA per la presenza di mutazioni del gene *KRAS* clinicamente rilevanti era pari all'87,2% e la sua specificità raggiungeva il 99,2%. Infine, i ricercatori hanno valutato se ctDNA possa fornire informazioni utili sui meccanismi di resistenza al blocco del recettore di crescita epidermico in 24 pazienti che avevano mostrato risposta alla terapia e successivamente manifestato recidiva: 23 di questi (96%) hanno sviluppato una o più mutazioni nei geni coinvolti nella via MAPK (mitogen-activated protein kinase). Considerati globalmente, questi dati suggeriscono che il DNA tumorale circolante rappresenti un biomarcatore largamente utilizzabile, sensibile e specifico, che può essere usato per vari scopi clinici e di ricerca in pazienti con molti diversi tipi di cancro. Wilson e coll nel 2015 [35] hanno analizzato il plasma di 126 pazienti affetti da linfoma a cellule B, in trattamento con EPOCH (etoposide, prednisone, vincristina, ciclofosfamide, doxorubicina) per la presenza di ctDNA, utilizzando un metodo quantitativo che permettesse di identificare segmenti di geni con tecnologie di sequenziamento avanzate. I campioni di sangue sono stati prelevati prima di iniziare il trattamento, in corso di trattamento e molti anni dopo la terapia. I risultati di questo studio hanno dimostrato che la presenza di ctDNA in corso di follow up era associata in modo statisticamente significativo alla comparsa di progressione di malattia, e che la presenza di ctDNA era predittiva di prognosi infausta almeno 4 mesi prima dell'evidenza clinica o radiologica di ripresa di malattia. Inoltre, il test del ctDNA era capace di predire quali pazienti non avrebbero risposto alla terapia in una fase molto precoce del trattamento (secondo ciclo), una strategia nota come "interim monitoring".

Pertanto il concetto di “interim ctDNA” sembra un marcatore promettente per identificare i pazienti che verosimilmente non risponderanno alla terapia.

L’isolamento di cellule tumorali circolanti dal sangue di pazienti affetti da diversi tipi di neoplasia (mammella, colon, prostata, polmone, vescica) ha certamente rappresentato un cambiamento di paradigma in oncologia, accompagnato da grandi successi, di cui sono esempi la validazione delle CTC come fattore prognostico nel carcinoma mammario metastatico e l’inclusione delle stesse nella stadiazione dei tumori mammari secondo il sistema TNM [36]. Ad oggi, più di 400 studi clinici hanno incluso le CTC come biomcatore, e più di 15.000 pubblicazioni scientifiche hanno contribuito a chiarire il ruolo prognostico delle CTC non solo in tumori metastatici, ma anche in fase precoce di malattia, suggerendo che esse possano rappresentare un surrogato del burden metastatico o, in alternativa, essere implicate in modo del tutto casuale nel processo di diffusione metastatica. E’ degno di nota il fatto che le CTC siano reperibili mesi, addirittura anni dopo la rimozione chirurgica del tumore primitivo; considerata la loro breve sopravvivenza nel circolo ematico, questa osservazione suggerisce che esista un pool di cellule (disseminated tumor cells, DTC) capaci di rimpiazzare le CTC nel tempo [37]. E’ stato ampiamente suggerito che le CTC possano fornire informazioni del tutto peculiari circa le caratteristiche molecolari della malattia minima residua (MRD) in pazienti affetti da tumori senza evidenza clinica e/o strumentale di metastasi a distanza. Identificare la MRD assume importanza cruciale al fine di orientare la terapia adiuvante sistemica, decisione che usualmente si basa sulla valutazione dei fattori prognostici di rischio clinici, biologici e molecolari, valutati sul tumore primitivo, che, come prima chiarito, non sempre riflette l’eterogeneità genetica della malattia.

E’ altresì vero che il concetto di CTC come biopsia liquida è strettamente legato alla sensibilità e specificità delle metodiche di isolamento, solitamente costituite da sofisticate procedure di arricchimento e di successivo isolamento. In particolare, i pazienti con malattia localizzata hanno sovente una concentrazione di CTC molto bassa [38], pertanto un efficiente isolamento di CTC in questi casi richiede saggi estremamente sensibili o volumi di sangue elevati.

Studi recenti hanno documentato il potenziale delle CTC come biopsia liquida non solo in quanto in grado di fornire informazioni sulla cellula tumorale a vari livelli (DNA, RNA, proteine), ma anche perché utilizzabili, contrariamente al ctDNA, per saggi *in vitro* e *in vivo*. Gli xenotrapianti di CTC in topi immunodeficienti [39], le colture cellulari derivate da CTC

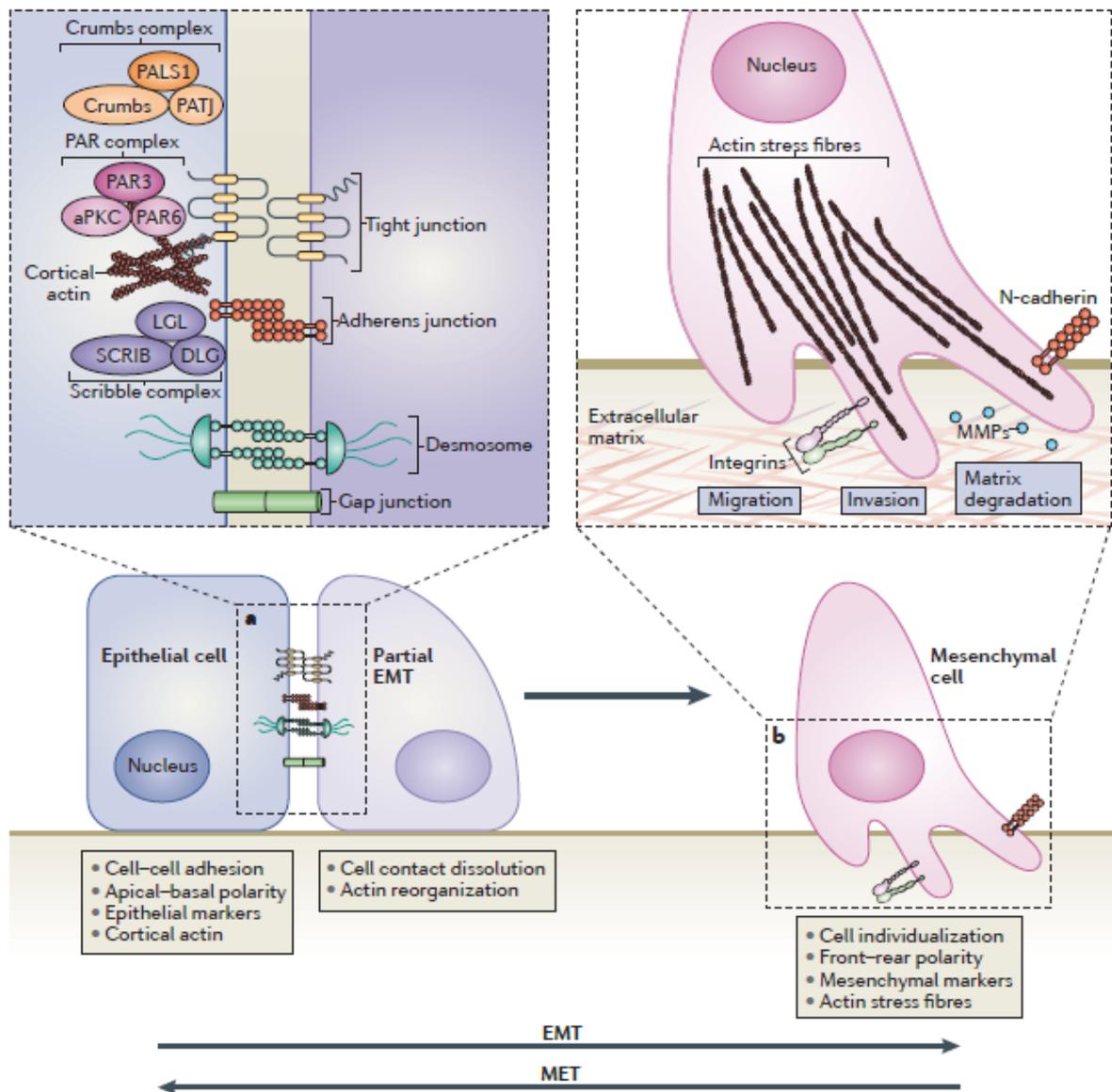
[40] e la possibilità di generare organoidi [41] da esse, sono alcuni esempi di come oggi sia possibile pensare alla biopsia liquida basata su CTC come ad un saggio funzionale. Analisi a livello della singola cellula hanno evidenziato che le CTC possono essere estremamente eterogenee da un punto di vista sia morfologico che funzionale, rendendo pertanto il loro isolamento una sfida complessa [42].

## **1.2 BIOLOGIA DELLE CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI**

### **1.2.1 Transizione epitelio-mesenchimale**

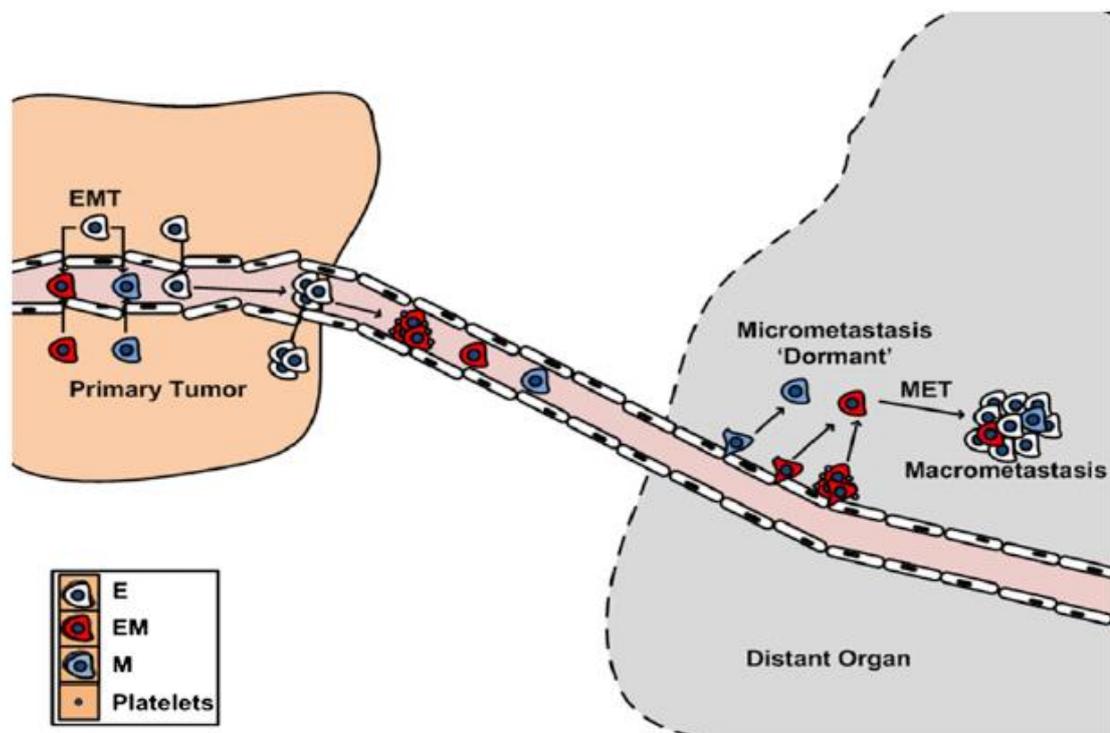
Nei primi anni ottanta fu formulata per la prima volta l'idea che le cellule epiteliali potessero sottoregolare le loro caratteristiche epiteliali e acquisire caratteristiche mesenchimali [43]. Tale processo viene oggi comunemente indicato come transizione epitelio-mesenchimale (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT), per enfatizzare la natura transitoria e reversibile (Mesenchymal to Epithelial Transition, MET) della trasformazione (Fig. 7). Di fatto, la capacità delle cellule epiteliali di transire, seppure parzialmente, verso cellule mesenchimali e viceversa sottende una intrinseca plasticità delle cellule, che possono cambiare aspetto e comportamento biologico adattandosi alle circostanze in ogni momento della loro vita. Durante la transizione epitelio-mesenchimale, in particolare, le cellule sottoregolano l'espressione di proteine epiteliali, incluse le molecole di adesione implicate nelle giunzioni intercellulari e riprogrammano il loro profilo di espressione genica al fine di promuovere una riorganizzazione del citoscheletro che favorisca la perdita della polarità apico-basale e la motilità cellulare. Una delle caratteristiche distintive della transizione epitelio-mesenchima è la sottoregolazione della E-caderina, necessaria per indebolire le giunzioni tra cellule. La repressione di geni che codificano per le molecole di adesione è accompagnata dall'attivazione di geni che codificano per proteine implicate nella adesione tra cellule mesenchimali. La perdita di E-caderina viene così bilanciata dalla sovraregolazione di N-caderina, portando al cosiddetto 'CADHERIN SWITCH' e alla alterazione dei meccanismi di adesione intercellulare, che diventano inevitabilmente più deboli favorendo il distacco e la migrazione delle cellule. I cambiamenti nell'espressione genica che contribuiscono alla inibizione del fenotipo epiteliale e alla acquisizione di quello mesenchimale sono principalmente regolati da un piccolo numero di fattori di trascrizione, tra cui SNAIL, TWIST e ZEB, che controllano l'uno l'espressione dell'altro e cooperano dal punto di vista funzionale per attivare ulteriori fattori di trascrizione utili al completamento del processo di EMT. La

transizione epitelio-mesenchima fu originariamente descritta nel contesto della normale differenziazione cellulare durante lo sviluppo embrionale. In questo contesto, l'attivazione del programma di EMT è necessaria al fine di consentire alle cellule epiteliali, altrimenti stazionarie, di guadagnare la capacità di muoversi e migrare in sedi distanti durante la morfogenesi, permettendo così lo sviluppo di tessuti e organi altamente specializzati [44].



**Fig. 7** Transizione epitelio-mesenchimale (EMT) **a**. Perdita delle giunzioni intercellulari e della polarità cellulare. Sottoregolazione dei geni epiteliali e concomitante attivazione dei geni mesenchimali. **b**. Riorganizzazione del citoscheletro epiteliale. Le cellule acquisiscono motilità e capacità invasive attraverso l'espressione di metalloproteinasi per la degradazione della matrice extracellulare. Il processo inverso di transizione mesenchima-epiteliale (MET) permette alle cellule che hanno completato una transizione epitelio-mesenchimale di acquisire nuovamente un fenotipo epiteliale.

L'attivazione aberrante del programma di EMT è stata recentemente implicata nel processo di disseminazione delle cellule tumorali dal tumore primitivo verso organi a distanza, attraverso la circolazione sanguigna. La transizione epitelio-mesenchima è di fatto necessaria durante tutte le fasi della cascata metastatica, dal distacco delle cellule epiteliali tumorali dalla massa primitiva, all'entrata in circolo delle cellule tumorali fino alla extravasazione e alla colonizzazione di organi a distanza, fase in cui il processo inverso di MET consente il ripristino delle giunzioni intercellulari e la riattivazione della crescita e proliferazione cellulare (Fig. 8). Recenti evidenze dimostrano, in particolare, che la transizione epitelio-mesenchima sia l'evento chiave nel processo per cui una cellula tumorale acquisisce un potenziale metastatico, diventando una cellula tumorale circolante [45]. Nel 2013, Yu e coll hanno dimostrato, attraverso una dettagliata analisi fenotipica di CTC di pazienti affetti da carcinoma metastatico della mammella, che un numero significativo di queste cellule tumorali mostravano un profilo intermedio epitelio-mesenchimale o puramente mesenchimale. Nello stesso modo, seppure in minore proporzione, anche i tumori mammari primitivi analizzati contenevano rare cellule tumorali che coesprimevano marcatori epiteliali e mesenchimali.



**Fig. 8** Ipotesi sull'origine e sul destino delle CTC. Cellule che hanno acquisito caratteristiche mesenchimali possono lasciare la sede del tumore primitivo e viaggiare in forma di cellule singole o di aggregati (cluster, microemboli). Negli organi a distanza, cellule singole o aggregati di cellule possono rimanere dormienti, prima di acquisire nuovamente un fenotipo epiteliale attraverso il processo inverso di transizione mesenchima-epitelio (MET), necessario per riprendere a proliferare e generare metastasi.

Nello stesso studio, gli autori hanno dimostrato una chiara associazione tra espressione di marcatori mesenchimali e presenza di cluster di CTC, piuttosto che di singole cellule con capacità migratoria, come invece ci si sarebbe aspettati [46, 47]. In un successivo lavoro, Aceto e coll. hanno elegantemente dimostrato che, sebbene più rari delle singole cellule in circolo, i cluster di CTC contribuiscono in modo determinante al processo di metastatizzazione e rappresentano un meccanismo di protezione delle cellule singole dall'anoikis, morte cellulare programmata innescata dal distacco di cellule ancoraggio-dipendenti dalla matrice extracellulare. In questo contesto, la trasformazione mesenchimale, come anche il mantenimento di alcune giunzioni intercellulari, potrebbero provvedere ai segnali di sopravvivenza necessari per eludere l'apoptosi. Attraverso lo studio di modelli murini, Aceto e coll. hanno altresì indagato sull'origine dei cluster di CTC presenti in circolo, concludendo che l'aggregazione intravasale di cellule non è un meccanismo determinante nella genesi dei cluster, che piuttosto hanno un'origine oligoclonale e derivano dall'aggregazione di cellule singole nel contesto del tumore primitivo [48, 49]. Prende così forma la teoria secondo la quale la transizione epitelio-mesenchima sarebbe l'evento chiave nella disseminazione tumorale, consentendo ad un ristretto gruppo di cellule di acquisire capacità migratorie e resistenza alla morte cellulare. Sarebbe proprio questo gruppo "leader" a guidare la disseminazione passiva di una coda di cellule epiteliali, configurando il processo noto come invasione collettiva [50, 51]. Diversi studi, inoltre, dimostrano che ai cluster di CTC si associano le piastrine, che favoriscono la coesione tra cellule e simultaneamente inducono parziale EMT tramite la secrezione di TGF- $\beta$  [52]. Per portare a termine la colonizzazione di organi a distanza, ultima fase del processo metastatico, le CTC che abbandonano la circolazione sanguigna devono mantenere capacità di autorinnovamento e pluripotenza, caratteristiche entrambe classicamente attribuite alle cellule tumorali staminali (cancer stem cell, CSC). Studi recenti hanno elucidato i network molecolari che mediano l'interconnessione tra EMT e staminalità. In particolare gli autori hanno dimostrato che le cellule con fenotipo ibrido epitelio/mesenchimale hanno maggiore probabilità di acquisire caratteristiche di staminalità. Dal momento che la EMT non può essere considerato un sistema binario, e che il concetto di staminalità deve essere ripensato come un tratto reversibile della cellula tumorale, e non come entità statica, una simile instabilità combinata potrebbe essere sfruttata dalle cellule tumorali per adattarsi al microambiente in cui si trovano. La plasticità delle CSC, strettamente dipendente dalla pressione selettiva del microambiente e delle terapie in particolare, consente infatti loro di subire continue modifiche fenotipiche, e di passare incessantemente da uno stato funzionale ad un altro (epiteliale/mesenchimale, staminale/non

staminale). Ne consegue che le CTC e le CSC non necessariamente rappresentano popolazioni cellulari distinte, dal momento che il pool di CTC in corso di transizione epitelio-mesenchimale può mostrare caratteri fenotipici di staminalità. Pertanto, il concetto di “cellule staminali circolanti” ha assunto negli anni crescente attenzione come “trait-d’union” tra cellule staminali tumorali e cellule tumorali circolanti [53]. D’altra parte, una simile eterogeneità delle CTC sottolinea la difficoltà nell’identificazione di marcatori di selezione appropriati, la cui ricerca può essere ulteriormente complicata dal fatto che tali marcatori sono spesso tessuto-specifici. E’ opinione condivisa che l’arricchimento e selezione delle CTC attraverso antigeni epiteliali rappresentino il limite principale delle metodiche attualmente disponibili, consentendo l’isolamento delle sole cellule che mantengono un fenotipo epiteliale. Pertanto, negli anni, i metodi di arricchimento delle CTC sono stati ottimizzati al fine di consentire l’isolamento anche di cellule con tratti mesenchimali [54].

### **1.2.2 Il razionale della biopsia liquida nel carcinoma del colon-retto**

Nonostante ormai un decennio di ricerca, lo studio delle cellule tumorali circolanti nel carcinoma del colon-retto (CRC-CTC) ha dato, ad oggi, risultati controversi. Il significato prognostico e predittivo della conta delle CTC nel carcinoma metastatico del colon-retto è stato dimostrato per la prima volta da Cohen e coll nel 2009, e successivamente validato da studi diversi. In accordo con la letteratura internazionale, un numero di CTC  $\geq 3/7,5$  ml è associato, in questi pazienti, a prognosi infausta e a scarsa risposta alla chemioterapia [55-58]. Nonostante il valore prognostico e predittivo delle CTC, rispetto a quanto dimostrato in altri tumori, quali il carcinoma della mammella e della prostata, nel carcinoma metastatico del colon le CTC sono però rilevabili solo nel 30-40% dei pazienti, e in questi pazienti il loro numero è straordinariamente esiguo. Diversi sono i fattori chiamati in causa per spiegare la difficile identificazione di CTC dai pazienti con carcinoma del colon-retto, ma gli studi sono concordi nel ritenere che la ragione principale sia rappresentata dalla peculiarità biologica di queste cellule, rispetto a quelle isolate da pazienti con tumori di altri distretti corporei [59]. Le CTC del tratto gastroenterico sono, ad esempio, caratterizzate da elevata espressione di molecole di adesione, che porta come conseguenza la loro tendenza spiccata ad aggregarsi in cluster, non facilmente identificabili con le metodiche standard di isolamento [60]. EpCAM, antigene prescelto da molte piattaforme di uso corrente per l’isolamento di CTC è sovente sottoregolato nel carcinoma del colon, rendendo le CTC “invisibili” nella fase di arricchimento delle stesse [61, 62]. La recente classificazione molecolare dei carcinomi del

colon-retto ha inoltre sottolineato come il sottotipo molecolare più aggressivo da un punto di vista clinico sia quello “mesenchymal-like”, ricco di cellule a chiaro fenotipo mesenchimale/staminale, caratterizzate da basso indice proliferativo e pertanto resistenti alle terapie, a suggerire che l’acquisizione di caratteristiche mesenchimali nel tumore del colon rappresenti un evento cruciale ai fini della progressione di malattia [63]. L’associazione, frequentemente descritta, tra EMT e carcinosi peritoneale è una ulteriore prova del legame esistente tra fenotipo mesenchimale delle cellule tumorali e potenziale metastatico delle stesse [64]. E’ verosimile, alla luce di quanto detto, che il pool di CTC con competenza metastatica nel carcinoma del colon-retto sia costituito principalmente da cellule mesenchimali, non evidenziabili con le metodiche tradizionali di isolamento. I meccanismi di mantenimento di CTC mesenchimali nella circolazione sanguigna non sono del tutto chiari, sebbene sia stata descritta una spiccata tendenza delle CRC-CTC a formare cluster con le piastrine, che rappresentano, come noto, la principale fonte di produzione del TFG- $\beta$  circolante, induttore chiave del processo di EMT [65]. La presenza di cellule mesenchimali, particolarmente nel sottotipo molecolare “mesenchymal-like” è stata associata a resistenza all’anticorpo monoclonale anti-EGFR, cetuximab, e ai chemioterapici utilizzati nel trattamento dei tumori del colon-retto, quali 5-fluorouracile ed oxaliplatino [66]. E’ verosimile pertanto che le CTC abbiano bisogno di mantenere attivato il programma EMT nel circolo ematico per eludere la morte cellulare indotta dai chemioterapici e dai farmaci a bersaglio molecolare. La possibilità di isolare e di caratterizzare da un punto di vista molecolare questo pool di CTC EMT/stem-like, che avrebbe enormi potenzialità nella identificazione di nuovi potenziali bersagli terapeutici, è al momento ostacolata dalla mancanza di marcatori affidabili. Se da una parte è noto che la capacità di autorinnovamento delle cellule staminali tumorali del colon sono strettamente dipendenti dal pathway di Wnt, Notch e HGF [67], i marcatori di superficie utilizzati per il loro isolamento (CD133, CD44, CD24, CDCP1, CXCR4, CD44v9, CD26) sono infatti ad oggi considerati “marcatori imperfetti”. La enorme eterogeneità intratumorale, che rende ragione del fatto che cloni diversi dello stesso tumore possano avere diversa espressione di questi marcatori, rappresenta una delle principali ragioni di tale “imperfezione”, costituendo pertanto una limitazione enorme all’uso della biopsia tradizionale. Tale limite sembra potenzialmente superabile grazie alla biopsia liquida. Scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare la fattibilità di una biopsia liquida capace di identificare CTC con tratti EMT, staminali e capaci di invasione collettiva, cardini fondamentali del processo di disseminazione metastatica, in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 ENUMERAZIONE DI CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI: CELLSEARCH®

L'isolamento e l'enumerazione delle CTC sono stati eseguiti tramite CellSearch® (Janssen Diagnostics, LLC, Raritan, NJ, USA), un sistema in grado di fornire informazioni real-time sulla biologia della cellula tumorale attraverso la valutazione diretta delle CTC. Mediante la combinazione di elevata accuratezza, specificità e riproducibilità, il sistema CellSearch® rappresenta l'unica piattaforma di laboratorio, approvata dalla Food and Drug Administration, che permette la caratterizzazione delle CTC standardizzando l'intero processo di raccolta del campione, selezione cellulare, colorazione e conteggio. E' possibile classificare la tecnologia su cui si basa il sistema come una citofluorimetria statica. Il sistema CellSearch® si compone di due strumenti: CellTrack Autoprep (Fig. 9) e CellTrack Analyzer II (Fig. 10). Il primo strumento, tramite l'uso di anticorpi monoclonali specifici coniugati a particelle ferromagnetiche concentra e purifica parzialmente le cellule.



**Fig. 9** CellTracks Autoprep, CellSearch®.

In un secondo passaggio vengono marcate le cellule purificate con anticorpi specifici atti a discriminare le cellule epiteliali circolanti.

La procedura si conclude con la deposizione del materiale in camere di conta (MagNest) per la successiva lettura. La capacità massima di processamento dello strumento è di otto campioni per volta. I campioni vengono poi letti uno alla volta dal CellTrack Analyzer II, il secondo strumento del sistema CellSearch®.

CellSearch® Epithelial Cell Kit e CellSearch® CXC Kit contengono un reagente di cattura ferrofluido e reagenti immunofluorescenti per la cattura e l'isolamento di cellule epiteliali. Il ferrofluido è composto da nanoparticelle con nucleo magnetico circondate da uno strato

polimerico rivestito con anticorpi diretti contro l'antigene EpCAM. Dopo la cattura immunomagnetica e l'arricchimento vengono aggiunti dei reagenti fluorescenti per l'identificazione e l'enumerazione delle CTC. CellSearch® Epithelial Cell Kit usa anti-CK-Phycoerythrin (PE) per marcare le citocheratine (CK) 8, 18 e 19 (specifiche per le cellule epiteliali), 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) per il nucleo e anti-CD45-Allophycocyanin (APC) specifico per i leucociti. CellSearch® CXC Kit usa gli stessi reagenti per il nucleo e il CD45 (leucociti), mentre usa anti-CK-Fluorescein Isothiocyanate (FITC) come marcatore al posto di PE. Sul CellTracks Analyzer II c'è un canale libero che può essere utilizzato per un marcatore selezionato dall'operatore. CellSearch® Epithelial Cell Kit lascia il canale dihexyloxacarboeyanine iodide (DIOC)/FITC aperto, mentre CellSearch® CXC Kit lascia il canale PE aperto.

Al termine della preparazione tramite Celltracks Autoprep System i campioni marcati vengono posti in una cartuccia inserita in un dispositivo di presentazione delle cellule denominato MagNest. Il potente campo magnetico del dispositivo MagNest attira le cellule epiteliali marcate magneticamente sulla superficie della cartuccia. Il CellTracks Analyzer II esegue automaticamente la scansione dell'intera superficie della cartuccia, acquisisce le immagini e mostra all'operatore tutti gli "eventi" in cui sia presente contemporaneamente la fluorescenza CK-PE o CK-FITC e DAPI. Le immagini vengono presentate sotto forma di galleria per la classificazione finale. Un evento viene classificato come cellula tumorale quando le sue caratteristiche morfologiche corrispondono a quelle di una cellula con fenotipo EpCAM+, CK+, DAPI+ e CD45-.



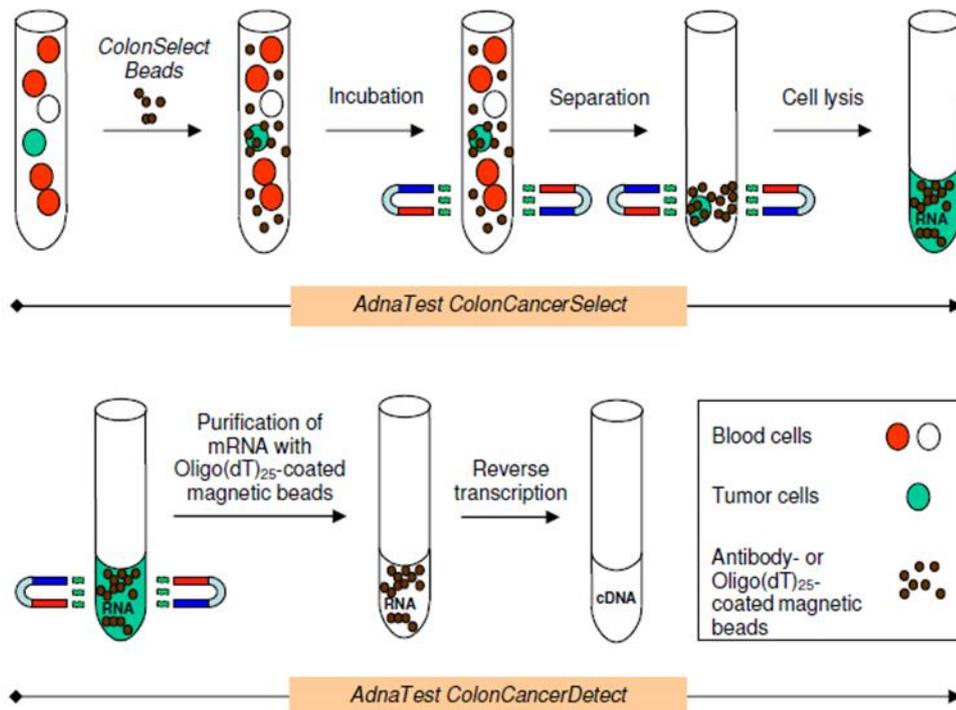
**Fig. 10** CellTracks Analyzer II, CellSearch®.

L'enumerazione delle CTC è stata effettuata su sangue intero prelevato tramite venipuntura o accesso venoso. Allo scopo sono state utilizzate provette (CellSave Preservative Tubes),

contenenti uno stabilizzatore cellulare che consente di mantenere i campioni fino a 96 ore a temperatura ambiente prima di essere processati. Il campione (7,5 ml) è stato diluito con tampone (6,5 ml), miscelato e centrifugato a 800g per 10 minuti con il freno disattivato. I campioni così preparati sono stati successivamente processati su CellTracks AutoPrep System; le cartucce, poste all'interno dei dispositivi MagNest, sono state lasciate al buio per 20 minuti ed analizzate entro 24 ore.

## 2.2 ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI: ADNATEST

Le CTC sono state isolate e caratterizzate mediante AdnaTest ColonCancer (AdnaGen, Langenhagen, Germania) (Fig. 11), che si compone di quattro kit: AdnaTest ColonCancerSelect, che permette l'arricchimento immunomagnetico di cellule tumorali mediante antigeni epiteliali e tumore-associati; AdnaTest ColonCancerDetect, che permette l'isolamento di mRNA di cellule tumorali pre-arricchite mediante biglie coniugate a oligo(dT)<sub>25</sub>; Sensiscript Reverse Transcriptase Kit (QIAGEN, Hilden, Germania), per la retrotrascrizione di mRNA in DNA complementare (cDNA); HotStarTaq Master Mix Kit (QIAGEN), per la caratterizzazione delle cellule mediante Multiplex PCR.



**Fig. 11** Rappresentazione schematica dell'isolamento di CTC mediante AdnaTest ColonCancer.

Da ogni paziente sono stati prelevati 5 ml di sangue venoso periferico. Il prelievo è stato effettuato con provette AdnaCollect (AdnaGen), contenenti EDTA. I campioni di sangue sono stati conservati a 4°C per un massimo di 4 ore, prima di essere processati.

I campioni ematici sono stati incubati con ColonSelect Beads, una miscela di anticorpi già pronta per l'uso, ponendo le provette in un agitatore a piatto rotante per trenta minuti a temperatura ambiente. Gli anticorpi diretti contro il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), l'antigene carcino-embrionario (CEA) e l'antigene associato al tumore gastrointestinale 733-2 (GA733-2) (EpCAM) sono coniugati a biglie magnetiche (Dynabeads) per marcare le cellule tumorali nel sangue periferico. ColonSelect Beads sono stati precedentemente lavati con tampone fosfato salino.

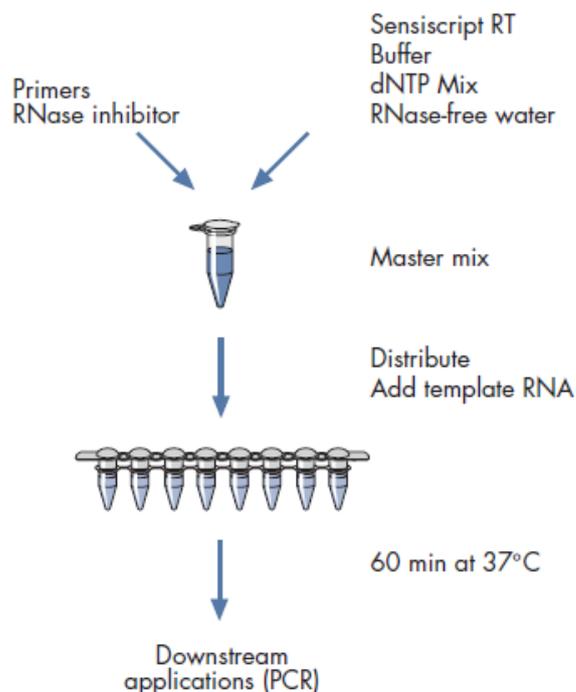
Successivamente le cellule marcate sono state estratte mediante AdnaMag, un concentratore di particelle magnetico, lavate con PBS (phosphate buffered saline), lisate con Lysis/Binding Buffer e separate da ColonSelect Beads mediante AdnaMag.

Alla soluzione contenente le cellule lisate è stata aggiunta un'aliquota di Oligo(dT)<sub>25</sub>Beads, per l'isolamento di mRNA, e lasciata in incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente. Al complesso mRNA/Oligo(dT)<sub>25</sub>Beads, estratto mediante AdnaMag e lavato con opportuni buffer, è stato aggiunto Tris-HCl. Dopo un minuto in AdnaMag, il sovrinatante è stato rimosso completamente e il complesso mRNA/beads è stato risospeso in acqua RNase-free e successivamente incubato ad una temperatura di 50°C per 5 minuti.

Per la sintesi di cDNA è stata utilizzata la Sensiscript Reverse Transcriptase (STR), un enzima eterodimerico ricombinante, espresso da *Escherichia coli*, con un'alta affinità per l'RNA, che consente un'efficiente trascrizione inversa con un'alta resa di cDNA.

La reazione avviene in un volume totale di 40 µl, contenenti 4 µl di Buffer RT 10X, 4 µl di una miscela dei quattro deossiribonucleotidi (dNTP), 0,5 µl di RNase Inhibitor (40 U/µl), 2 µl di SRT e 29,5 µl di complesso mRNA/bead o H<sub>2</sub>O RNase-free (come controllo negativo).

Il cDNA è stato sintetizzato in un termociclatore ad una temperatura di 37°C per 60 minuti (Fig. 12).



**Fig. 12** Rappresentazione schematica della sintesi di cDNA mediante STR.

L'analisi di mRNA, isolato dalle CTC, è stata eseguita mediante Multiplex Polymerase Chain Reaction (Multiplex PCR), che consiste nell'utilizzo di una miscela di primer. Pertanto è stato possibile amplificare più frammenti di DNA nella stessa reazione di amplificazione, riducendo sia i costi che i tempi di analisi.

La miscela consiste in 4 paia di primer specifici per l'amplificazione di 3 marcatori tumorali (*GA733-2*, *CEA* e *EGFR*) e di un gene costitutivo ( *$\beta$ -actina*).

La PCR è stata eseguita, in termociclatore, in un volume finale di 50  $\mu$ l, contenente 25  $\mu$ l di HotStarTaq Master Mix (QIAGEN), 4  $\mu$ l di PrimerMix ColonDetect (AdnaGen), 8  $\mu$ l di cDNA e 13  $\mu$ l di H<sub>2</sub>O alle seguenti condizioni: iniziale pre-denaturazione a 95°C per 15 minuti, seguita da 35 cicli di denaturazione a 94°C per 45 secondi, annealing a 58°C per 45 secondi, estensione a 72°C per 45 secondi ed una finale estensione a 72°C per 10 minuti.

Dopo l'amplificazione, un'aliquota dei prodotti è stata sottoposta ad elettroforesi su gel di agaroso concentrato al 4% previa colorazione con Bromuro di Etidio 1  $\mu$ g/ml, un colorante in grado di intercalarsi tra le basi del DNA. Il gel è stato fatto migrare mantenendo un voltaggio costante (tra 60 e 80 mV) per un tempo necessario alla completa separazione dei frammenti di DNA. In seguito i campioni sono stati osservati tramite una sorgente luminosa di luce ultravioletta (transilluminatore a UV) confrontando i loro pesi con un marcatore di pesi molecolari di riferimento (PhiX haeIII). Dopo la corsa elettroforetica e la separazione delle bande il gel è stato fotografato.

### **2.3 ISOLAMENTO DI CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI: SCREENCELL®**

Nel dispositivo ScreenCell® (ScreenCell, Paris, France) il sangue fluisce attraverso una membrana microporosa permettendo la separazione di CTC dalle altre cellule ematiche in base alle dimensioni, pertanto con modalità antigene-indipendente, in condizioni completamente riproducibili e standardizzate. Questi dispositivi sono stati sviluppati per l'isolamento sia di cellule fissate per gli studi citologici (ScreenCell® Cyto) che di cellule vive per colture cellulari (ScreenCell® CC) e per gli studi di biologia molecolare (ScreenCell® MB).

I dispositivi di filtrazione comprendono un serbatoio, un filtro e un supporto rimovibile, che permette l'inserimento di un tubo di raccolta. La membrana in policarbonato da 18  $\mu$ m di spessore ha pori circolari, di  $7,5 \pm 0,36 \mu$ m per l'isolamento di singole cellule e di  $15 \pm 0,36 \mu$ m per i cluster, distribuiti in modo casuale ( $10^5$  pori/cm<sup>2</sup>).

### 2.3.1 Screencell<sup>®</sup> Cyto Kit

Da ogni paziente, sono stati prelevati 6 ml di sangue venoso periferico in provette contenenti EDTA. I campioni di sangue sono stati conservati a 4°C e filtrati entro 3 ore dalla raccolta. Per lisare gli eritrociti, a 3 ml di sangue sono stati aggiunti 4 ml di tampone di diluizione specifico per cellule fissate, costituito principalmente da saponine e paraformaldeide (ScreenCell FC2). Dopo 8 minuti di incubazione a temperatura ambiente, il sangue diluito è stato inserito nel serbatoio del dispositivo e filtrato grazie ad un gradiente di pressione fornito da un vacutainer di 9 ml inserito nel supporto rimovibile. Dopo la filtrazione, il filtro è stato lavato con 1,6 ml di PBS per rimuovere residui di eritrociti. La filtrazione è stata generalmente completata entro circa 3 minuti (Fig. 13). Il filtro è stato quindi smontato e lasciato asciugare su carta assorbente. Per ciascun paziente, la filtrazione è stata condotta in duplicato.

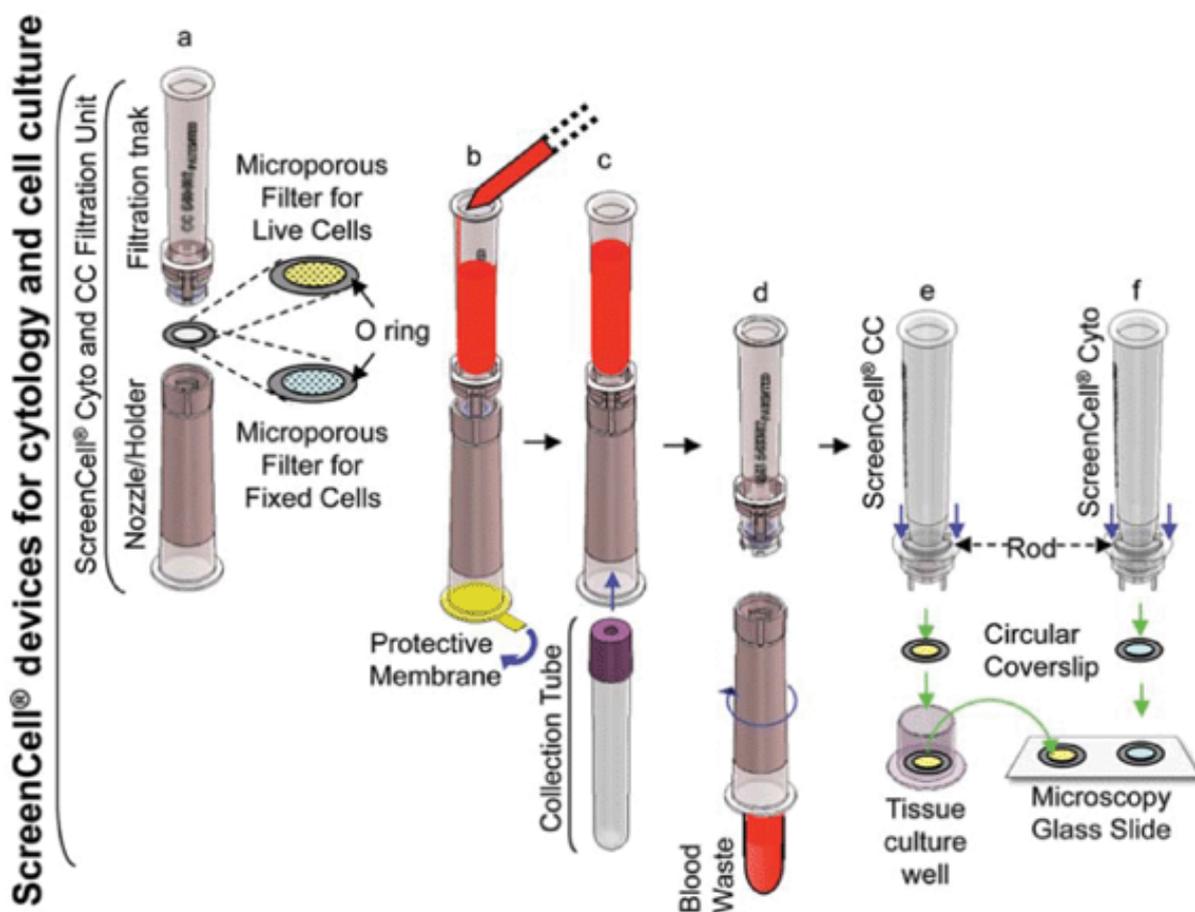
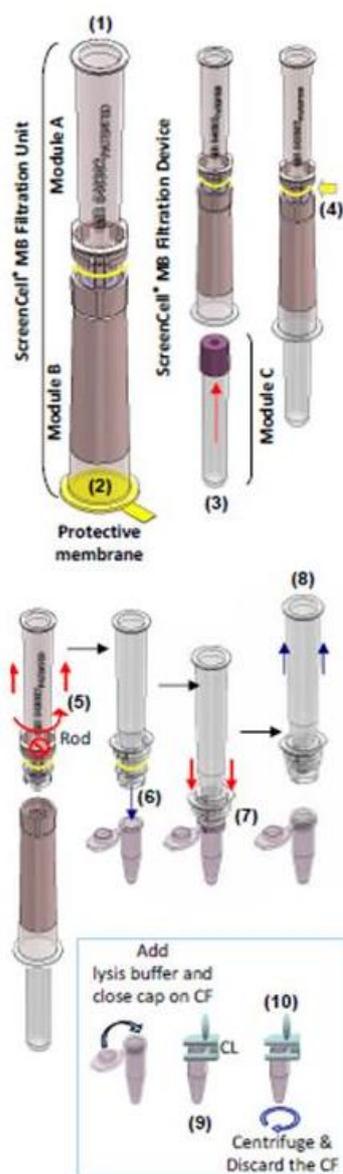


Fig. 13 Rappresentazione schematica dell'isolamento di CTC mediante ScreenCell<sup>®</sup> Cyto Kit.

### 2.3.2 Screencell<sup>®</sup> MB Kit

Da ogni paziente, sono stati prelevati 6 ml di sangue venoso periferico in provette contenenti EDTA. I campioni di sangue sono stati conservati a 4°C e filtrati entro 3 ore dalla raccolta. Ad ogni campione di sangue è stato aggiunto 1 ml di tampone di diluizione (ScreenCell LC), che consente una lisi blanda di globuli rossi lasciando vive le altre cellule. Dopo 2 minuti di incubazione a temperatura ambiente, il sangue diluito è stato inserito nel serbatoio del dispositivo, filtrato e lavato con 1,6 ml di PBS. La filtrazione è stata generalmente completata entro circa 3 minuti. Il filtro/capsula è stato quindi smontato e inserito in una eppendorf da 1,5 ml (Fig. 14). I campioni sono stati conservati a -80°C o direttamente sottoposti all'estrazione di RNA.



**Fig. 14** Rappresentazione schematica dell'isolamento di CTC mediante ScreenCell<sup>®</sup> MB Kit.

## 2.4 ESTRAZIONE DI RNA E RT-PCR SULLE CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI

L'estrazione di RNA totale dalle CTC è stata effettuata utilizzando RNeasy<sup>®</sup> Micro Kit (QIAGEN). Ad ogni campione sono stati aggiunti 165 µl di tampone di lisi RLT. Dopo centrifugazione a 12.000g per 10 minuti, la capsula è stata scartata, mentre l'eluato è stato portato ad un volume di 350 µl con tampone RLT. Dopo l'aggiunta di etanolo 70%, il campione è stato trasferito in una colonna inserita in una eppendorf da 2 ml e centrifugato a 8.000g per 15 secondi. L'eluato è stato scartato. Nella colonna sono stati aggiunti 350 µl di tampone RW1. Dopo centrifugazione a 8.000g per 15 secondi, l'eluato è stato scartato. Una soluzione contenente 10 µl di DNase I è stata aggiunta direttamente sulla membrana della colonna. Dopo 15 minuti di incubazione e l'aggiunta di 350 µl di tampone RW1, il campione è stato centrifugato a 8.000g per 15 secondi. La colonna è stata inserita in una nuova eppendorf. Dopo l'aggiunta di 500 µl di buffer RPE e una centrifugazione a 8.000g per 15 secondi, l'eluato è stato scartato. La colonna è stata lavata con etanolo 80% e centrifugata a 8.000g per 2 minuti. La colonna è stata, quindi, trasferita in una nuova eppendorf e centrifugata, aperta, a tutta velocità per 5 minuti per asciugare la membrana. La colonna è stata, infine, trasferita in una eppendorf da 1,5 ml. Dopo l'aggiunta di 14 µl di H<sub>2</sub>O RNase-free direttamente al centro della membrana, il campione è stato centrifugato a tutta velocità per eluire l'RNA. La colonna è stata scartata.

La Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) è stata utilizzata per analizzare l'espressione dei geni target. L'RNA è stato quantificato mediante spettroscopia. Una quantità pari a 1 µg per ogni campione è stato retrotrascritto utilizzando il First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) in accordo con il protocollo fornito dal produttore. Il DNA complementare (cDNA), ottenuto da ciascun campione, è stato utilizzato per la successiva amplificazione attraverso PCR con un set di primer specifici per i geni target ed il gene housekeeping *gliceraldeide fosfato deidrogenasi (GAPDH)* (SIGMA-ALDRICH).

Per la caratterizzazione delle cellule tumorali del colon sono stati utilizzati primer specifici per *aldeide deidrogenasi 1 (ALDH1)*, *CD44*, *CD133* (come marcatori di staminalità), *MRP-5* (marcatore di chemioresistenza) e *survivina* (marcatore di resistenza all'apoptosi). I primer utilizzati e loro condizioni di annealing sono riportati nella tabella 1.

Dopo l'amplificazione, un'aliquota dei prodotti è stata sottoposta ad elettroforesi orizzontale su gel di agaroso concentrato al 2% previa colorazione con Bromuro di Etidio 1 µg/ml. Il gel è stato fatto migrare mantenendo un voltaggio costante (tra 60 e 80 mV) per circa 30 minuti, poi i campioni sono stati osservati tramite una sorgente luminosa di luce ultravioletta (transilluminatore a UV) confrontando i loro pesi con un marcatore di pesi molecolari di riferimento (PhiX haeIII). Dopo la corsa elettroforetica e la separazione delle bande il gel è stato fotografato.

	Primer	Sequenze 5'→3'	Annealing	Cicli
<i>GAPDH</i>	upstream	AGATGTTCCAATATGATTCC	30°C/30 sec	30
	downstream	TGGACTCCACGACGTACTCAG		
<i>ALDH1</i>	upstream	TCCTGGTTATGGGCCTACAG	30°C/30 sec	30
	downstream	CTGGCCCTGGTGTAGAATA		
<i>CD44</i>	upstream	CAGATCGATTGAATATAACCTGCCGC	68°C/30 sec	30
	downstream	AGGGATTCTGTCTGTGCTGTCGGTGAT		
<i>CD133</i>	upstream	ACCAACACCAAGAACAAGGC	59°C/30 sec	32
	downstream	GGAGCTGACTGAATTGAGG		
<i>MRP-5</i>	upstream	CTAGAGAGACTGTGGCAAGAAGAGC	68°C/30 sec	40
	downstream	AAATGCCATGGTTAGGATGGC		
<i>survivina</i>	upstream	CAGATTGAATCGCGGGACCC	60°C/30 sec	32
	downstream	CCAAGTCTGGCTCGTTCTCAG		

**Tab. 1** Primer e condizioni di annealing utilizzati nella reazione di PCR.

## 2.5 ANTICORPI

Per gli esperimenti di immunofluorescenza sono stati usati i seguenti anticorpi: anti-EpCAM (clone C-10 e H-70), anti-vimentina (V9 e H-84), anti-N-caderina (13A9), anti-E-caderina (67A4), anti-β-catenina (E-5), anti-CK20 (N-13), anti-HIF-1α (H-206) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), anti-EpICD (4A7) (SIGMA-ALDRICH), anti-CD44v6 (R&D System), anti-citocheratina 20 (Dako, Glostrup, Denmark), anti-pancitocheratina (anti-panCK) (2A4) (Abcam, Cambridge, MA, USA).

## 2.6 ANALISI DELLE CTC IN IMMUNOFLUORESCENZA

Gli esperimenti di immunofluorescenza (IF) sono stati condotti per valutare la localizzazione intracellulare e di superficie degli antigeni di interesse.

Per ciascun paziente in esame sono stati analizzati due filtri. A ciascun filtro è stata applicata la colorazione istochimica Giemsa (Carlo Erba, MI, Italia), utilizzando il colorante diluito 1:10 con acqua distillata, ed è stato lasciato in incubazione per 20 minuti a temperatura ambiente. Il filtro è stato quindi lavato con acqua distillata in modo da rimuoverne l'eccesso, posto su un vetrino portaoggetti e coperto da un vetrino coprioggetto tramite interposizione di montante acquoso, Faramount Aqueous Mounting Medium (Dako). I filtri sono stati osservati al microscopio ottico Leica (Leitz Camera, Wetzlar, Germany) e in questo modo sono state individuate le cellule adese. Sono state scattate immagini con una fotocamera digitale computerizzata, Olympus Camedia 5050 (Olympus Inc., Tokyo, Japan). Dopo l'osservazione i filtri sono stati conservati alla temperatura di -20°C, in attesa dei successivi esami immunocitochimici.

Per l'esame di immunofluorescenza, entrambi i filtri di ciascun paziente, privati del vetrino coprioggetto, sono stati dapprima fissati in una soluzione di paraformaldeide al 4% per 5 minuti alla temperatura di 4°C e successivamente permeabilizzati mediante immersione in una soluzione di PBS e 0,01% TWEEN 20 per 20 minuti a temperatura ambiente.

### **2.6.1 Esperimenti di doppia marcatura**

I filtri sono stati incubati per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo monoclonale anti-CK20 (1:50). I filtri sono stati, quindi, incubati, per 1 ora, con un anticorpo secondario fluorescinato Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (FITC). Ogni filtro è stato nuovamente incubato con un secondo anticorpo primario. Uno dei due filtri è stato incubato con l'anticorpo anti-N-caderina (1:50), mentre il secondo filtro è stato incubato per un'ora a temperatura ambiente con l'anticorpo anti-CD44v6 (1:100). Successivamente, entrambi i filtri sono stati incubati con anticorpo secondario fluoriscinato Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (H+L) (TRITC) per un'ora a temperatura ambiente.

E' stata effettuata la controcolorazione dei nuclei con DAPI (Life Technologies) per 10 minuti. Tra i passaggi di incubazione sono stati effettuati lavaggi con soluzione di PBS e 0,01% TWEEN 20.

I segnali fluorescenti sono stati visualizzati con microscopio Olympus IX50 dotato di filtri per la fluorescenza. Sono state considerate CTC le cellule positive all'anticorpo anti-CK 20. Di queste è stata valutata anche la contemporanea positività del secondo segnale. Sono state acquisite immagini ad ingrandimento 40X.

## 2.6.2 Esperimenti di tripla marcatura

Sono state effettuate delle colorazioni triple così suddivise:

- EpICD mouse (1:80), EpCAM rabbit (1:100), CK20 goat (1:100);
- vimentina rabbit (1:100), CD44v6 mouse (1:100), CK20 goat (1:100);
- EpICD mouse (1:80),  $\beta$ -catenina rabbit, CK20 goat (1:100);
- CK20 goat (1:100), HIF-1 $\alpha$  (1:100), vimentina mouse (1:100);

I filtri sono stati incubati con gli anticorpi primari specifici per l'antigene di interesse diluiti in PBS 3% BSA, 3% FBS, 0,001% NaN<sub>3</sub>, 0,1% Triton X-100 overnight a 4°C in ambiente umido.

Il giorno seguente i filtri sono stati lavati in PBS e messi in incubazione al buio a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario donkey anti-goat Alexa Fluor 647 (Molecular Probes) diluito 1:1000 in PBS 3% BSA, 3% FBS 0,001% NaN<sub>3</sub>, 0,1% Triton X-100 per 45 minuti. Quindi, sono stati lavati in PBS e successivamente bloccati con goat serum diluito 1:10 per 30 minuti, il siero è stato rimosso senza lavare e sono stati aggiunti gli altri 2 anticorpi secondari goat anti-rabbit Alexa Fluor 555 e goat anti-mouse 488.

Successivamente i filtri sono stati lavati in PBS e incubati per 15 minuti al buio con il DAPI diluito in PBS 3% BSA, 3% FBS, 0,001% NaN<sub>3</sub>, 0,1% Triton X-100 con l'aggiunta della RNAasi. Successivamente sono stati ancora lavati in PBS, montati in presenza del Prolong Antifade (Invitrogen), fissati su un vetrino portaoggetti e analizzati al microscopio confocale (Olympus FV1000).

## 2.7 STATO MUTAZIONALE DI KRAS IN CAMPIONI DI TESSUTO

Il DNA è stato estratto da sezioni di tessuto FFPE utilizzando DNA minikit (QIAGEN), seguendo le istruzioni del produttore. Il frammento dell'esone 2 del gene *KRAS*, 321 bp, che include i codoni 12 e 13, è stato amplificato utilizzando la seguente coppia di primer: *KRAS* F: 5'-TTTGAAATAATTTTTCATATAAAGGTGAG-3' e *KRAS* R: 5'-TCATGAAAATGGTCAGAGAAACC-3'. Le condizioni di PCR sono state le seguenti: iniziale pre-denaturazione a 95°C per 5 minuti, seguita da 35 cicli di denaturazione 94°C per 1 minuto, annealing a 59°C per 1 minuto, estensione a 72°C per 1 minuto ed una finale estensione a 72°C per 7 minuti. In seguito, gli amplificati sono stati purificati con Exostar 1-Step (VWR International), secondo le istruzioni del produttore. Le reazioni di sequenziamento sono state eseguite per entrambi i filamenti di DNA mediante Big Dye Terminator v1.1 (Applied Biosystems) su un totale di 10 ng di prodotti di amplificazione purificati. La

purificazione dei frammenti è stata eseguita utilizzando colonne Centrisep Spin (Princeton separazione) secondo le istruzioni del produttore. L'analisi della sequenza è stata effettuata su Applied Biosystems 3130XL Genetic Analyzer.

## **2.8 STATO MUTAZIONALE E SOVRAESPRESSIONE DI *KRAS* IN CTC**

Per la pre-amplificazione di *KRAS* sono stati utilizzati HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) e primer scelti nella regione compresa tra l'esone 2 e l'esone 4 (MWG), alle seguenti condizioni: 95°C per 15 minuti, seguiti da 39 cicli di denaturazione a 94°C per 45 secondi, annealing a 56°C per 45 secondi, estensione a 72°C per 45 secondi ed una estensione finale a 72°C per 10 minuti. La concentrazioni dei frammenti ottenuti è stata valutata utilizzando Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent). L'espressione del gene *KRAS* sulle CTC è stata quantificata in un range compreso tra 0 e 5,12 ng/μl, definendo overespressione tutti i valori al di sopra del 5% del valore massimo identificato in questo setting. Scegliendo questo cut-off, sono stati esclusi i valori compresi tra 0 e 0,25 ng/μl . Dopo la pre-amplificazione è stato eseguito il test per la ricerca della mutazione G12X utilizzando Ampli-set-K-Ras (Diachem s.r.l.). L'amplificazione è stata effettuata come segue: 95°C per 10 minuti, seguita da 50 cicli di denaturazione a 94°C per 40 secondi, annealing a 52°C per 40 secondi, estensione a 72°C per 30 secondi ed una fase di estensione finale 72°C per 10 minuti. In seguito, il protocollo di digestione enzimatica con l'enzima MVA I è stato eseguito overnight e i prodotti della digestione successivamente visualizzati su gel di agaroso al 4%.

### 3. RISULTATI

#### 3.1 CTC NEL CARCINOMA METASTATICO DEL COLON-RETTO: ISOLAMENTO CON METODI EPCAM-DIPENDENTI

##### 3.1.1 Enumerazione delle cellule tumorali circolanti in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto

###### 3.1.1.a Disegno dello studio

Abbiamo condotto un'analisi retrospettiva su una popolazione di 119 pazienti affetti da mCRC, eterogenei per linea di terapia, con l'obiettivo di valutare il significato prognostico e predittivo della conta delle CTC, eseguita tramite analisi CellSearch<sup>®</sup>. I prelievi di sangue sono stati eseguiti prima dell'inizio della terapia e ogni 9-12 settimane di trattamento, contestualmente alla rivalutazione clinico-strumentale, per un follow-up di 24 mesi. Per l'analisi del valore prognostico e predittivo delle CTC sono stati presi in considerazione due diversi cut-off: quello standard di  $\geq 3$  CTC/7,5 ml di sangue periferico e quello di  $\geq 1$  CTC/7,5 ml.

###### 3.1.1.b Significato prognostico della conta delle CTC in pazienti con mCRC

Nell'insieme, la presenza di CTC è stata dimostrata in 42/119 (35%) pazienti, dei quali 24 avevano un numero di CTC superiore al cut-off standard. Il significato prognostico delle CTC

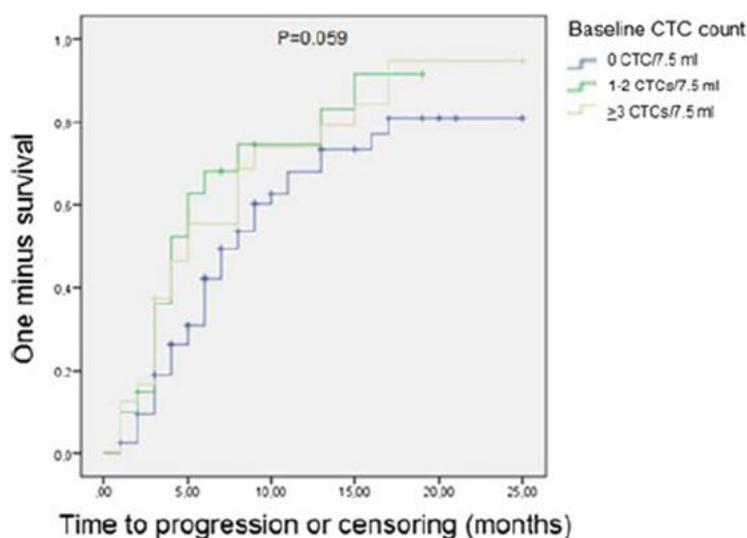
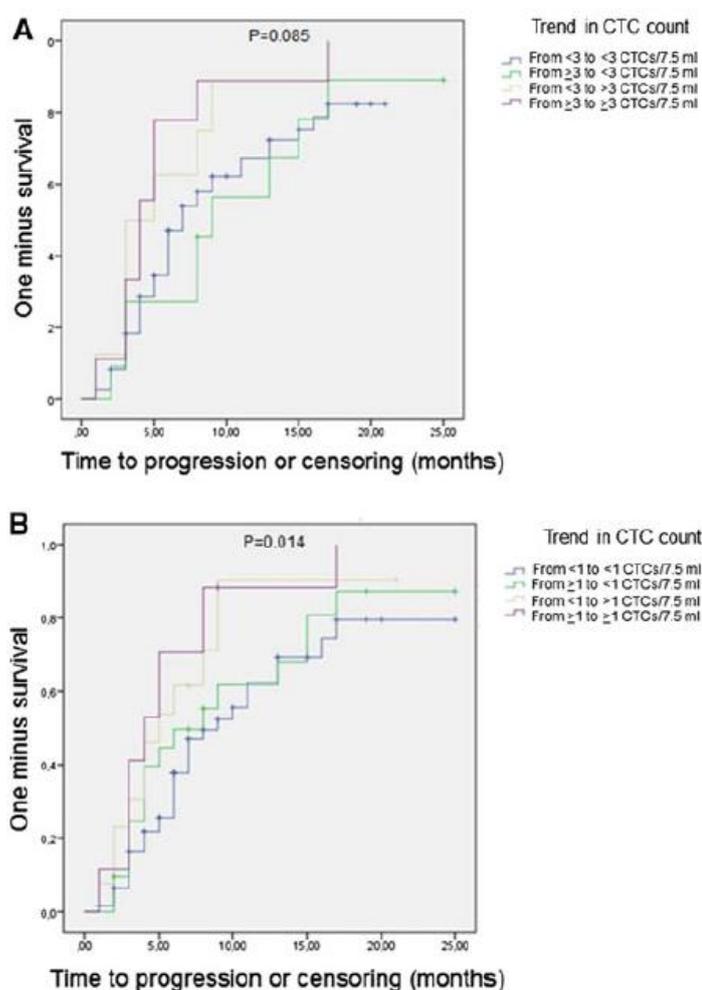


Fig. 15 Curva di Kaplan-Meier per la PFS in pazienti con 0, 1-2,  $\geq 3$  CTC/7,5 ml al basale.

è stato definito valutando la sopravvivenza libera da progressione (progression free survival, PFS) nei tre gruppi di pazienti con 0, 1-2 e 3 CTC/7,5 ml di sangue. L'analisi di sopravvivenza è stata condotta con il metodo Kaplan-Meier e ha dimostrato una PFS di 8, 4 e 5 mesi nei tre gruppi di pazienti rispettivamente (Fig.15).

### 3.1.1.c Significato predittivo delle CTC in pazienti affetti da mCRC

Un totale di 100 pazienti affetti da mCRC è stato valutato per l'analisi del valore predittivo delle CTC. L'analisi di sopravvivenza (PFS) è stata condotta con metodo Kaplan-Meier, tenendo in considerazione entrambi i cut-off di  $\geq 3$  CTC/7,5 ml e  $\geq 1$  CTC/7,5 ml rispettivamente (Fig. 16). In entrambi i casi, le curve di sopravvivenza hanno dimostrato un valore predittivo statisticamente significativo in PFS tra gruppi di pazienti definiti sulla base dell'andamento del numero di CTC durante la terapia. Diversamente dai dati pubblicati in



**Fig. 16** Curve di Kaplan-Meier per la PFS in base ai cambiamenti del numero di CTC in corso di trattamento usando il cut-off di  $\geq 3$  CTC/7,5 ml (a) e il cut-off di  $\geq 1$  CTC/7,5 ml (b).

letteratura, i nostri risultati dimostrano che anche la presenza di una sola CTC, mantenuta o guadagnata a 9-12 settimane di terapia, configura un sottogruppo di pazienti con prognosi sfavorevole.

### 3.1.1.d Significato prognostico e predittivo delle CTC in pazienti affetti da mCRC in terapia con bevacizumab

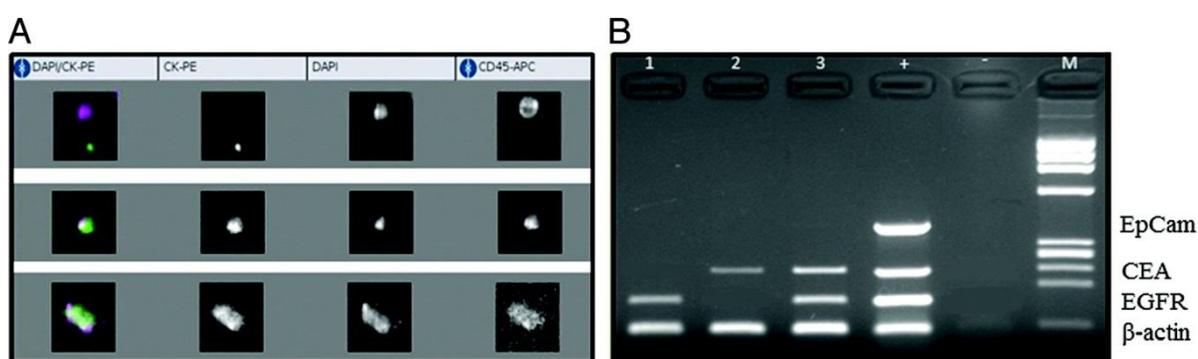
Sulla base di quanto dimostrato nel carcinoma metastatico della mammella, ove nelle pazienti trattate con bevacizumab l'analisi CellSearch<sup>®</sup> non rileva CTC nella maggior parte dei casi, abbiamo selezionato un gruppo di 27 pazienti affetti da carcinoma metastatico del colon-retto candidati a terapia di prima linea con bevacizumab, allo scopo di valutare il significato prognostico e predittivo della conta delle CTC in questa popolazione di pazienti. Il valore predittivo delle CTC è stato definito sulla base della correlazione tra variazione nel numero di CTC e risposta radiologica, dopo 9-12 settimane dall'inizio della terapia (Tab. 2). Al prelievo basale, la presenza di CTC ( $\geq 3/7,5$  ml in 13 pazienti, 1-2 CTC/7,5 ml in 9 pazienti) è stata dimostrata in 22/27 pazienti. Dopo 9-12 settimane di trattamento, il numero di CTC si è significativamente ridotto nella maggior parte dei pazienti (assenza di CTC in 24 pazienti e 1 CTC/7,5 ml in 3 pazienti). Degno di nota è il fatto che in più della metà dei pazienti in cui, in corso di terapia, il CellSearch<sup>®</sup> non ha evidenziato la presenza di CTC, la rivalutazione strumentale ha dimostrato una chiara progressione di malattia. L'assenza di qualunque significato predittivo della conta delle CTC in pazienti trattati con bevacizumab potrebbe rappresentare un primo esempio di mascheramento delle CTC indotto da farmaci e suggerire cautela nell'uso del sistema CellSearch<sup>®</sup> per l'isolamento delle CTC in sottogruppi predefiniti di pazienti.

(A) CTC count (bevacizumab)	Imaging response		
		SD/PR	PD
First blood draw	0	5	
	1-2	9	
	$\geq 3$	13	
6-12 weeks blood draw	0	24	14
	1-2	3	1
	$\geq 3$	0	0

**Tab. 2** Valore predittivo delle CTC in pazienti con mCRC.

### 3.1.2 Isolamento di cellule tumorali circolanti in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto: CellSearch® ed AdnaTest a confronto

Abbiamo condotto un'analisi prospettica su una popolazione di 39 pazienti affetti da mCRC, con l'obiettivo di valutare la sensibilità di due metodi EpCAM-dipendenti (CellSearch® ed AdnaTest) nell'isolamento delle CTC (Fig. 17). Nonostante sia un metodo EpCAM-dipendente, AdnaTest presenta il vantaggio di poter identificare su CTC EpCAM-positivo la trascrizione di geni di interesse, che nel caso del carcinoma del colon-retto sono rappresentati da EGFR e CEA. Da ogni paziente è stato effettuato un prelievo di sangue periferico (7,5 ml) per l'analisi delle CTC mediante CellSearch® e uno (5 ml) per analisi delle CTC mediante AdnaTest, previo consenso informato. La presenza di CTC è stata dimostrata nel 20% dei pazienti mediante analisi CellSearch® e nell'81% dei pazienti mediante analisi AdnaTest. Tra i marcatori utilizzati da AdnaTest per l'isolamento di CTC colon-specifiche, EGFR era il più rappresentato (81% dei casi), seguito da CEA (48%) e da EpCAM (19%). All'analisi statistica non è stata trovata alcuna correlazione tra i due metodi di isolamento, così come non è stata trovata alcuna correlazione tra presenza di CTC e le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti.



**Fig. 17** Analisi CellSearch® (A) e Multiplex PCR eseguita dopo l'isolamento di CTC con AdnaTest (B) in tre pazienti esemplificativi con mCRC. La figura mostra che l'assenza di CTC all'analisi CellSearch® è coerente con la mancanza di espressione di EpCAM, come visualizzato all'analisi AdnaTest. Al contrario, l'approccio con la Multiplex PCR permette l'identificazione di CTC sottovalutato con CellSearch®, attraverso l'espressione positiva di EGFR e CEA..

### 3.1.3 Caratterizzazione di cellule tumorali circolanti in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto: stato mutazionale di KRAS

La disponibilità di un metodo capace di combinare la cattura immunomagnetica delle CTC con una Multiplex PCR per lo studio dei target di interesse, ci ha indirizzato ad ulteriori studi

atti a chiarire quale fosse lo stato mutazionale di *KRAS* nelle CTC rispetto al tessuto del tumore primitivo. A tale scopo sono stati arruolati 39 pazienti con mCRC, per 24 dei quali era disponibili l'analisi mutazionale di *KRAS* sul tessuto. La mutazione del codone 12 è stata trovata in 7/24 campioni di tessuto analizzati (29%), mentre nelle CTC la stessa mutazione è stata identificata in 5/24 casi (21%). Non è stata trovata una correlazione statisticamente significativa tra la mutazione di *KRAS* nel tessuto tumorale e quella nelle CTC. Nella stessa serie di pazienti, la sovraespressione di *KRAS* nelle CTC è stata rilevata in 8/24 casi (33%). In nessuno di questi otto campioni è stata trovata una concomitante attivazione della mutazione di *KRAS* nelle CTC o nel tessuto tumorale, suggerendo che l'attivazione della via di segnale attraverso una mutazione del gene o la sovraespressione potrebbero essere funzionalmente equivalenti e, quindi, mutualmente esclusivi. È degno di nota il fatto che, combinando la mutazione del codone 12 tissutale con la medesima mutazione o overespressione di *KRAS* sulle CTC, un totale di 20/24 pazienti è stato trovato portatore di alterazioni *KRAS* attivanti, a conferma del ruolo cruciale di questo gene nella patogenesi del mCRC. Nessuna correlazione statistica è stata trovata tra mutazioni di *KRAS* e overespressione di *KRAS*, così come tra mutazioni di *KRAS* ed overespressione di EGFR sulle CTC. Anche la correlazione tra mutazioni di *KRAS* sul tessuto e sulle CTC non è risultata statisticamente significativa.

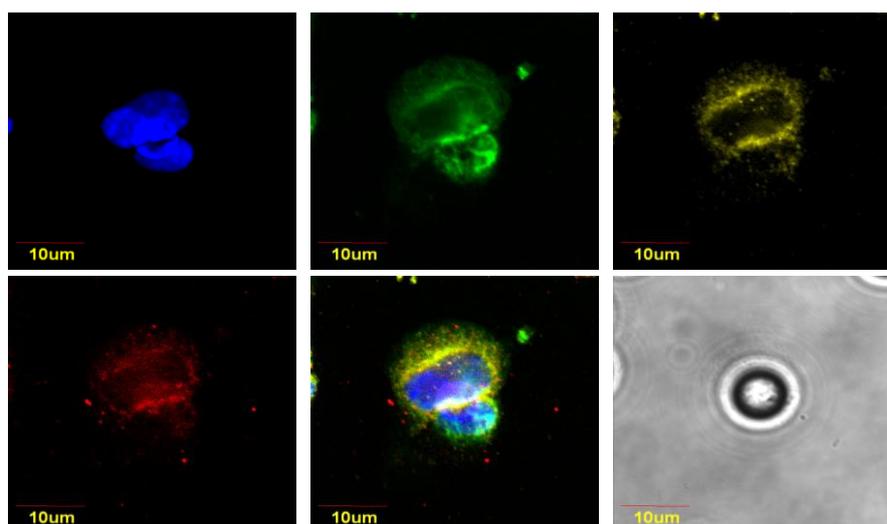
### **3.2 CTC NEL CARCINOMA METASTATICO DEL COLON-RETTO: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE CON METODO EPCAM-INDIPENDENTE**

Considerata l'enorme variabilità di espressione di EpCAM sulle CTC di pazienti con mCRC e la conseguente inadeguatezza dei sistemi EpCAM-dipendenti nell'isolamento di CTC in questo tipo di tumore, tutti gli studi successivi sono stati effettuati utilizzando, per l'arricchimento di CTC, un metodo EpCAM-indipendente (ScreenCell®).

#### **3.2.1 Caratterizzazione in immunofluorescenza di cellule tumorali circolanti in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto: espressione di EpCAM rispetto alla sua frazione extracellulare**

Allo scopo di verificare la variazione nell'espressione di EpCAM (frazione esterna) in CTC da pazienti con mCRC e quindi spiegare l'inadeguatezza del CellSearch® nell'isolarle, sono stati arruolati 10 pazienti con mCRC a progressione di malattia. Da ogni paziente è stato

effettuato un prelievo di sangue periferico (7,5 ml) per l'analisi delle CTC mediante CellSearch<sup>®</sup> e uno (3 ml) per l'analisi delle CTC mediante ScreenCell<sup>®</sup> Cyto Kit, previo consenso informato. Per gli studi in immunofluorescenza, sono stati utilizzati anticorpi anti-CK20 (citocheratina colon-specifica), anti-EpCAM (frazione esterna) e anti-EpICD (frazione interna) (Fig. 18). La colorazione è stata interpretata come segue: negativa quando una debole espressione non rilevabile è stata osservata in meno del 5% delle cellule tumorali, debole (+) quando l'espressione del marcatore è stata osservata nel 5-25%, moderata nel 25-50% (++) e forte quando è stata osservata in più del 75% delle cellule tumorali (+++). All'analisi CellSearch<sup>®</sup>, 3/10 pazienti erano CTC-positivi (1 CTC/7,5 ml in due pazienti e 2 CTC/7,5 ml in un paziente). Sui filtri di ogni paziente, invece, erano presenti sia singole cellule che cluster CK20-positivi. Inoltre, nei pazienti con 0 CTC al CellSearch<sup>®</sup> l'espressione di EpICD era maggiore rispetto ad EpCAM; al contrario, nei pazienti con 1 o 2 CTC, l'espressione di EpICD e di EPCAM erano paragonabili.

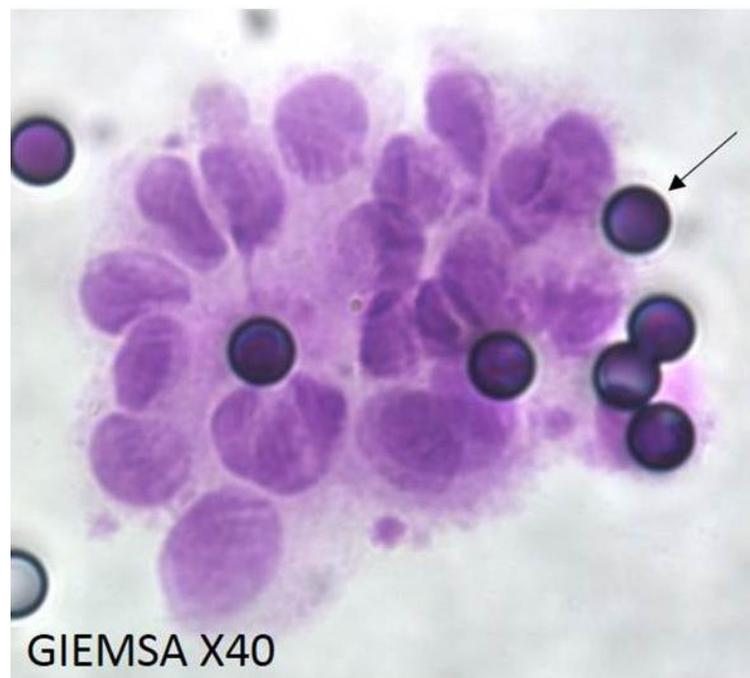


**Fig. 18** Coespressione di EpCAM (giallo), EpICD (verde) e CK20 (rosso).

### **3.2.2 Caratterizzazione in immunofluorescenza di cellule tumorali circolanti in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto: identificazione del fenotipo ibrido epitelio-mesenchimale**

Obiettivo di questo studio è stato quello di verificare l'ipotesi per cui le CTC sfuggirebbero all'isolamento tramite CellSearch<sup>®</sup>, a causa della ridotta espressione di antigeni epiteliali dovuta all'attivazione del processo di transizione epitelio-mesenchima. Alla luce delle recenti evidenze che dimostrano la contemporanea espressione di marcatori mesenchimali ed epiteliali sulle CTC, si è inteso inizialmente dimostrare che l'uso di una metodica non dipendente dall'espressione di antigeni epiteliali consente di isolare CTC caratterizzate dal

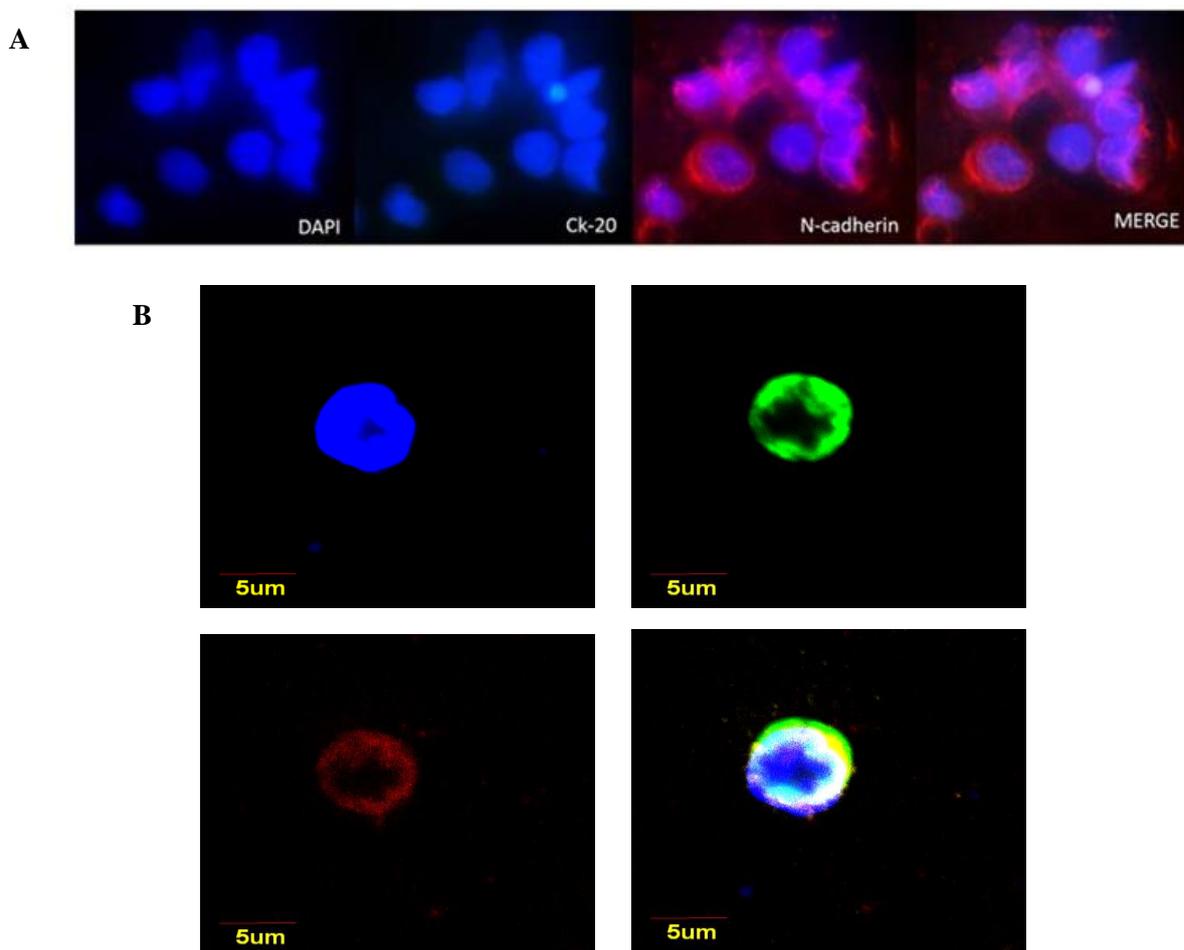
cosiddetto “fenotipo EMT parziale”. A tale scopo sono stati arruolati 10 pazienti con mCRC a fallimento del regime terapeutico di prima linea. Da ogni paziente sono stati prelevati 6 ml di sangue periferico, previo consenso informato, per l’isolamento delle CTC mediante ScreenCell<sup>®</sup> Cyto Kit, e 7,5 ml di sangue per l’analisi delle CTC con CellSearch<sup>®</sup>. Le cellule presenti sul filtro dopo isolamento con ScreenCell<sup>®</sup> sono state considerate tumorali se soddisfatti i seguenti criteri morfologici: diametro nucleare >7  $\mu$ m, membrana nucleare irregolare, presenza di grandi nucleoli. Le cellule hanno mostrato un elevato rapporto nucleo/citoplasma (Fig.19).



**Fig. 19** Immagine rappresentativa di un cluster di CTC colorato con Giemsa (la freccia indica il poro).

Per gli studi in immunofluorescenza, allo scopo di valutare la contemporanea espressione di marcatori epiteliali e mesenchimali, sono stati utilizzati anticorpi anti-CK20 (citocheratina colon-specifica) e anti-N-caderina/anti-vimentina (marcatori di EMT). La colorazione è stata interpretata come segue: negativa quando una debole espressione non rilevabile è stata osservata in meno del 5% delle cellule tumorali, debole (+) quando l’espressione del marcatore è stata osservata nel 5-25%, moderata (++) nel 25-50% e forte (+++) quando è stata osservata in più del 75% delle cellule tumorali. Abbiamo evidenziato in tutti i pazienti la presenza di CTC caratterizzate dalla contemporanea presenza di CK20 (+/++) e di marcatori EMT (+/+++) (N-caderina in 3 pazienti, vimentina in 7 pazienti), a suggerire un fenotipo epitelio-mesenchimale ibrido delle CTC (figura 20, pannello A e B). L’analisi del sangue

degli stessi pazienti con CellSearch® ha evidenziato la presenza di CTC solo in 1 paziente, ad ulteriore dimostrazione della inadeguatezza del sistema nell'isolamento di cellule con fenotipo ibrido epiteliale-mesenchimale.

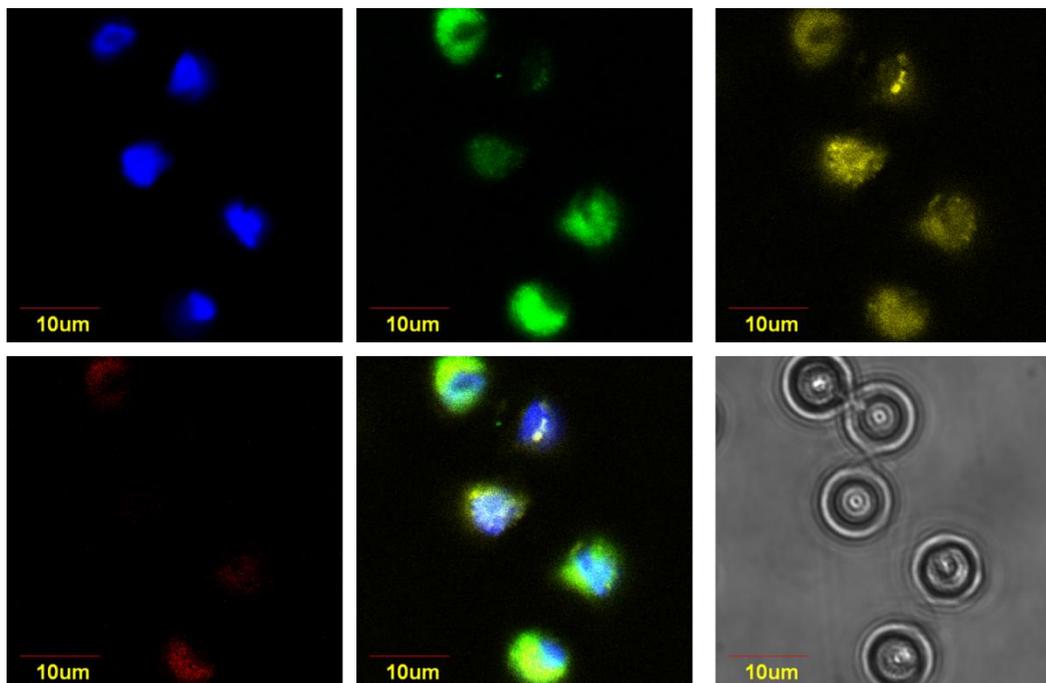


**Fig. 20** Identificazione di CTC a fenotipo ibrido epitelio-mesenchimale. Pannello A: coespressione di CK20 e N-caderina; Pannello B: coespressione di CK20 (rosso) e vimentina (verde).

### **3.2.3 Caratterizzazione molecolare di cellule tumorali circolanti in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto: espressione di marcatore di staminalità su CTC a fenotipo ibrido epitelio/mesenchimale**

Allo scopo di verificare la presenza di marcatori di staminalità sulle CTC a fenotipo ibrido epitelio-mesenchimale (Fig. 21), sono stati arruolati 6 pazienti con mCRC a fallimento del regime terapeutico di seconda linea. Da ogni paziente sono stati prelevati 6 ml di sangue periferico, previo consenso informato, per l'isolamento delle CTC mediante ScreenCell®. Per

gli studi in immunofluorescenza, sono stati utilizzati anticorpi anti-CK20 (citocheratina colon-specifica), anti-vimentina (marcatore di EMT) e anti-CD44v6 (marcatore di staminalità nel carcinoma del colon). La colorazione è stata interpretata come segue: negativa quando una debole espressione non rilevabile è stata osservata in meno del 5% delle cellule tumorali, debole (+) quando l'espressione del marcatore è stata osservata nel 5-25%, moderata nel 25-50% (++) e forte quando è stata osservata in più del 75% delle cellule tumorali (+++). In tutti i pazienti abbiamo identificato CTC caratterizzate da variabile espressione della CK20 (+/++) e forte espressione (+++) di vimentina e CD44v6.

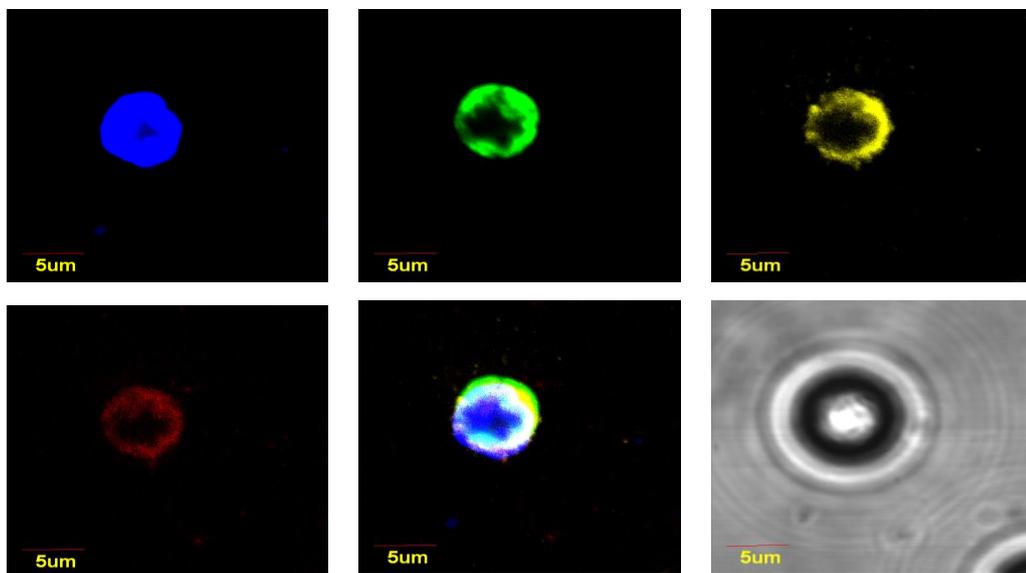


**Fig. 21** Associazione di fenotipo ibrido epitelio/mesenchimale e CD44v6 . (verde: CD44v6; giallo: vimentina; rosso: CK20).

### 3.2.4 Caratterizzazione molecolare di cellule tumorali circolanti in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto: HIF-1 e fenotipo ibrido epitelio-mesenchimale

Nel carcinoma del colon-retto il fattore 1 alfa ipossia inducibile (HIF-1 $\alpha$ ) è descritto come mediatore chiave del processo EMT, attraverso la attivazione del fattore di trascrizione ZEB. Allo scopo di chiarire se HIF-1 sia implicato nella induzione di fenotipo ibrido epitelio-mesenchimale sulle CTC, sono stati arruolati 8 pazienti con mCRC a fallimento del regime terapeutico di seconda linea. Da ogni paziente sono stati prelevati 6 ml di sangue periferico,

previo consenso informato, per l'isolamento delle CTC mediante ScreenCell<sup>®</sup>. Per gli studi in immunofluorescenza, sono stati utilizzati anticorpi anti-CK20 (citocheratina colon-specifica) anti-vimentina (marcatore di EMT) e anti-HIF-1 $\alpha$ . La colorazione è stata interpretata come segue: negativa quando una debole espressione non rilevabile è stata osservata in meno del 5% delle cellule tumorali, debole (+) quando l'espressione del marcatore è stata osservata nel 5-25%, moderata nel 25-50% (++) e forte quando è stata osservata in più del 75% delle cellule tumorali (+++). In 6/8 pazienti abbiamo identificato CTC caratterizzate da fenotipo ibrido, con variabile espressione della CK20 (+/++) e forte espressione (++) di vimentina. HIF-1 $\alpha$  è stato trovato espresso in tutte le CTC (+/++) (Fig. 22).

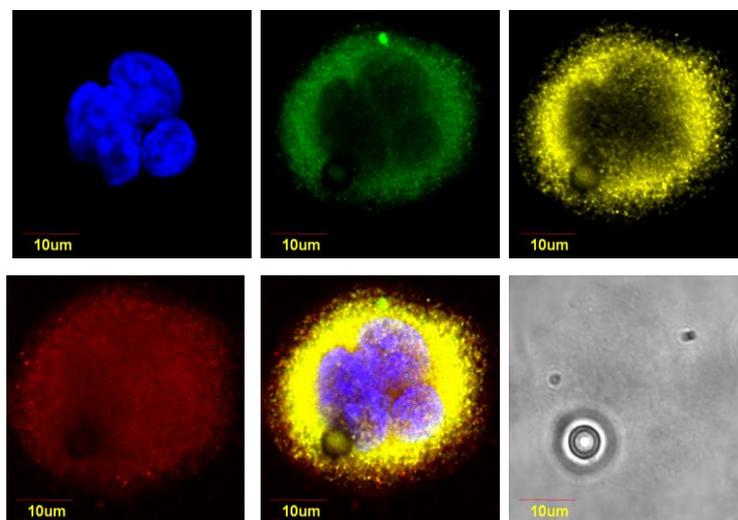


**Fig. 22** Associazione di fenotipo ibrido epitelio/mesenchima e HIF-1. (verde: vimentina; giallo: HIF-1; rosso: CK20).

### 3.2.5 Isolamento e caratterizzazione di cluster di CTC da pazienti con carcinoma del colon-retto: risultati preliminari

Allo scopo di valutare la presenza di cluster, abbiamo arruolato 10 pazienti con mCRC a fallimento del regime terapeutico di seconda linea. In questi pazienti la presenza di cluster è stata valutata usando filtri costruiti ad hoc, con pori di dimensione  $15 \pm 0,36 \mu\text{m}$ , distribuiti in modo casuale ( $10^5$  pori/cm<sup>2</sup>). In 5/10 pazienti (50%) abbiamo trovato cluster, costituiti da un numero di cellule variabile (3-20). Per gli studi in immunofluorescenza, sono stati utilizzati gli stessi anticorpi utilizzati per la colorazione delle cellule singole (anti-CK20, anti-vimentina, anti-CD44v6). Su tutti i cluster è stata evidenziata la presenza di CTC ibride

epiteliali/mesenchimali, nelle quali il marcatore di staminalità CD44v6 era costantemente espresso (+++) (Fig. 23).

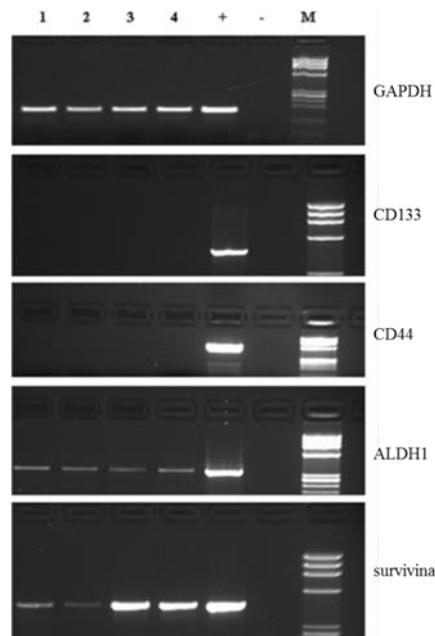


**Fig. 23** Cluster: associazione di fenotipo ibrido epitelio/mesenchimale e CD44v6 (verde: CD44v6; giallo: vimentina; rosso: CK20).

### 3.2.6 Caratterizzazione molecolare di cellule tumorali circolanti in pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto: marcatori di farmacoresistenza

A tale scopo sono stati reclutati 40 pazienti con diagnosi di carcinoma metastatico del colon-retto, con l'obiettivo di valutare inizialmente il significato prognostico di un pannello di marcatori di farmacoresistenza e di presunta staminalità sulle CTC di pazienti in corso di trattamento con chemioterapia. I marcatori prescelti sono stati: CD44, ALDH1, CD133 (stem-like), survivina (resistenza alla apoptosi farmaco-indotta), MRP5 (resistenza a 5-fluorouracile ed oxaliplatino). Il prelievo (6 ml) per l'isolamento delle CTC mediante ScreenCell<sup>®</sup> MB Kit è stato effettuato, previo consenso informato, prima dell'inizio del trattamento con 5-fluorouracile o oxaliplatino. L'RNA è stato isolato e analizzato mediante RT-PCR per l'espressione di *CD44*, *CD133*, *ALDH1*, *MRP5* e *survivina*. 27/40 (67%) pazienti sono stati trovati positivi per la presenza di CTC. Nel gruppo di pazienti CTC(+), 12/27 (45%) hanno avuto progressione di malattia (PD) e 15/27 (55%) hanno avuto una risposta clinica (CR) in corso di trattamento. CTC-ALDH1(+) sono state trovate in 9 (33%) dei 27 pazienti CTC(+). Tra questi pazienti ALDH1(+), 6 hanno avuto progressione di malattia (PD) e 3 una risposta completa (CR). È stata trovata una correlazione significativa tra l'espressione di ALDH1 e prognosi peggiore (P<sub>V</sub> 0,046). CTC-CD44(+) e CTC-CD133(+) sono state trovate in 3/27

(11%) e 2/27 (7%) pazienti, rispettivamente. Nessuna correlazione è stata trovata tra l'espressione di CD44 e CD133 ( $p=0,8$  per entrambi). La survivina è stata rilevata sulle CTC di 13/27 pazienti (48%). Nel gruppo dei pazienti survivina(+), 10/13 (77%) hanno avuto PD e 3/13 (23%) CR. Nel gruppo di 14 pazienti survivina(-), PD è stata osservata in 2/14 (14%) dei casi e CR in 12/14 (86%). La differenza nella PFS tra i due gruppi è stata rilevata statisticamente significativa ( $p<0,001$ ) (Fig. 1B). MRP5 è stato trovato espresso sulle CTC in 15/27 pazienti (55%). Di questi pazienti, 12 hanno avuto PD e 3 CR. I pazienti MRP5(+), pertanto, hanno avuto una sopravvivenza libera da progressione significativamente più breve rispetto ai pazienti le cui CTC sono risultate negative per l'espressione MRP5 ( $p<0,001$ ).



**Fig. 24** Espressione di GAPDH, CD133, CD44, ALDH-1, MRP5 e survivina in CTC da quattro pazienti con mCRC (1-4); +, controllo positivo; -, controllo negativo (campione senza cDNA); M, marker molecolare.

In figura 24, sono riportati i prodotti di amplificazione RT-PCR per tutti i geni esaminati sulle CTC in 4 pazienti esemplificativi. L'espressione di tutti i marcatori analizzati sulle CTC è riportata nella tabella 3.

Pazienti	CD44	CD133	ALDH1	survivina	MRP5	Risposta alla terapia	PFS
1	-	-	-	-	-	CR	24
2	-	-	-	-	-	CR	24
3	-	-	-	-	-	CR	24
4	-	-	-	+	+	CR	6
5	-	-	-	+	+	PD	8
6	-	-	-	+	+	CR	12
7	-	-	-	-	-	CR	24
8	-	-	-	+	+	PD	2
9	-	-	-	-	-	CR	24
10	-	-	-	+	+	PD	5
11	-	-	+	+	+	PD	3
12	-	-	-	-	-	CR	19
13	-	-	+	+	+	PD	9
14	-	-	+	-	+	PD	7
15	-	-	+	-	-	CR	15
16	-	+	+	+	+	PD	7
17	-	-	-	+	+	PD	7
18	-	-	+	+	+	PD	5
19	-	-	-	-	-	CR	24
20	+	-	+	+	+	PD	2
21	-	-	+	+	+	CR	7
22	-	-	-	-	-	CR	22
23	-	-	-	+	+	PD	4
24	+	-	-	-	-	CR	20
25	-	-	-	-	+	PD	18
26	-	-	-	-	-	CR	24
27	+	+	+	-	-	CR	8

**Tab. 3** Espressione di CD44, CD133, ALDH1, survivina e MRP5 in una popolazione con e senza resistenza alla chemioterapia (PD = progressione della malattia; CR = risposta clinica).

## 4. DISCUSSIONE

La capacità di un tumore maligno di disseminare a distanza inizia nel momento in cui la cellula tumorale subisce alterazioni che consentono la sua motilità e la sua invasività [68]. Quando cellule singole o aggregate tra loro in cluster acquisiscono l'abilità di staccarsi dal tessuto d'origine e migrare nel sistema linfatico o nella circolazione sanguigna inizia il processo di metastatizzazione della neoplasia, prima causa di morte nei pazienti affetti da tumori solidi. Modelli sperimentali dimostrano che sebbene milioni di cellule tumorali siano continuamente rilasciate nella circolazione sanguigna o linfatica, una minima parte di esse raggiunge organi a distanza, sopravvivono in uno stato di dormienza, eludono l'attacco del sistema immune dell'ospite o delle terapie sistemiche anti-tumorali e genera una massa tumorale secondaria [69, 70]. Il continuo adattamento a microambienti diversi costringe le cellule tumorali disseminate ad un notevole grado di plasticità, risorsa indispensabile alle cellule per procedere lungo la cascata metastatica. L'analisi di cellule tumorali circolanti, secondo questa prospettiva, può contribuire all'elaborazione di un modello esemplificativo dello switch dalla malattia localizzata a quella sistemica e offrire elementi chiave nella comprensione della biologia dei tumori [71]. La storia moderna della ricerca sulle cellule tumorali circolanti ha inizio con l'elaborazione di metodi di isolamento basati su una prima fase di arricchimento delle cellule, che consenta di fatto di concentrarne un numero sufficiente in un piccolo volume, superando il limite concettuale della rarità delle cellule tumorali nel sangue. L'intuizione della necessità di una fase di arricchimento per distinguere una cellula tumorale circolante tra milioni di cellule ematopoietiche, rappresenta l'origine della ricerca sulle CTC e, nello stesso momento, il suo limite intrinseco principale. La continua evoluzione delle conoscenze sulla biologia delle CTC, infatti, impone una costante rielaborazione dei marcatori più idonei per il loro isolamento e determina la necessità di ottimizzare i metodi per l'analisi delle CTC, rendendo la flessibilità del sistema un requisito fondamentale per la longevità delle apparecchiature. Sulla base di quanto detto, appare quanto mai evidente che ad una piattaforma come il CellSearch<sup>®</sup> vadano attribuiti l'accessibilità delle cellule tumorali circolanti e la nascita del concetto di biopsia liquida e, contemporaneamente, il fallimento dell'idea che un unico sistema possa leggere la biologia di tumori di origine diversa e con profili molecolari estremamente distanti. A complicare ulteriormente lo scenario, si pone il fatto che il CellSearch<sup>®</sup> sia stato ideato e sviluppato per catturare cellule epiteliali, teoricamente assenti nella circolazione sanguigna. Un simile presupposto, presto tradito dalle evidenze sulla transizione epitelio-mesenchima, ha inevitabilmente relegato la macchina "tra

color che son sospesi”, ostacolando il pieno utilizzo delle sue indiscusse potenzialità. Esistono ad oggi più di quaranta sistemi diversi per l’isolamento delle cellule tumorali circolanti [72] e continuamente vengono pubblicati lavori scientifici che dimostrano la fattibilità di nuovi metodi alternativi. La classificazione convenzionale dei sistemi di isolamento delle CTC si basa sulla distinzione dicotomica tra metodi che distinguono le CTC dal background di cellule ematopoietiche in funzione delle loro caratteristiche fisiche o metodi che si basano sulle caratteristiche biologiche delle CTC [73]. Di fatto, poiché le strategie di arricchimento delle CTC sono per lo più fondate sulla selezione positiva di cellule che esprimono EpCAM, i metodi di isolamento delle CTC possono essere ulteriormente distinti tra quelli antigene-dipendenti o antigene-indipendenti. Tra i numerosi sistemi EpCAM-dipendenti, figurano il CellSearch<sup>®</sup>, che deve all’approvazione per uso clinico della FDA il suo utilizzo diffuso negli studi sul significato clinico delle CTC, e il sistema AdnaTest, originariamente usato nel carcinoma metastatico della mammella e successivamente esteso anche al carcinoma del colon-retto, della prostata e dell’ovaio [74]. L’approccio quantitativo proposto dal sistema CellSearch<sup>®</sup> ha consentito di muovere la ricerca sulle CTC da un ambito meramente sperimentale a quello della medicina traslazionale, offrendo alla biopsia liquida l’opportunità di qualificarsi come strumento utile alla personalizzazione delle cure oncologiche. In una prima fase conoscitiva del sistema CellSearch<sup>®</sup> nel nostro laboratorio, abbiamo monitorato più di mille pazienti affetti da tumori solidi metastatici e partecipato alla validazione definitiva del significato prognostico delle CTC nel carcinoma metastatico della mammella [75]. La nostra esperienza diretta ci ha permesso di osservare differenze significative tra i diversi ambiti analizzati e di rilevare criticità peculiari, attribuibili alla biologia delle singole malattie studiate. Gli studi condotti finora hanno attribuito alla conta delle cellule tumorali circolanti un chiaro significato prognostico, con dati robusti in particolare nei pazienti con carcinoma metastatico di mammella, prostata e colon-retto. Risale ormai al 2004 lo studio pilota condotto da Cristofanilli e coll sul significato prognostico delle CTC in pazienti con carcinoma mammario metastatico [76]. Da allora molti studi clinici si sono succeduti per investigare le possibili applicazioni della biopsia liquida in questo setting di malattia, dimostrando inequivocabilmente il ruolo di marcatore prognostico delle cellule tumorali circolanti [75]. Se nel carcinoma mammario la presenza di sottotipi molecolari biologicamente distinti ha verosimilmente indebolito i dati sul valore predittivo di risposta alle terapie delle cellule tumorali circolanti (SWOG), nel carcinoma della prostata resistente alla castrazione (mCRPC) il numero delle CTC, unitamente ai livelli sierici di LDH, si è rivelato essere un marcatore surrogato di sopravvivenza globale, nello studio di fase III che ha

condotto all'approvazione della terapia con abiraterone acetato e prednisone in pazienti con mCRPC, dopo terapia con docetaxel. Delle patologie menzionate, le tre in cui il sistema CellSearch<sup>®</sup> ha ricevuto l'approvazione per uso clinico dalla FDA, soltanto nel carcinoma metastatico del colon-retto la rilevanza clinica delle cellule tumorali circolanti non ha raggiunto i livelli di evidenza attesi. Una meta-analisi di recente pubblicazione ha infatti confermato il valore prognostico delle CTC nei pazienti affetti da carcinoma metastatico del colon-retto, pur dimostrando una notevole eterogeneità tra gli studi inclusi, particolarmente nei metodi di isolamento delle CTC e nel timing dei prelievi eseguiti in corso di terapia. Le differenze biologiche esistenti tra neoplasie del colon e del retto e la notevole varietà delle terapie somministrate, incluse quelle a bersaglio molecolare, possono entrambe aver contribuito a determinare l'inconsistenza dei dati sul significato prognostico delle CTC prima dell'inizio e in corso di trattamento. Ad oggi, infatti, pur essendo stato originariamente stabilito un cut-off di 3 CTC/7,5 ml di sangue, non è da ritenersi definito il numero di CTC rilevante ai fini della prognosi. In particolare, su una popolazione di 119 pazienti affetti da carcinoma metastatico del colon-retto, eterogenei per linea di terapia, abbiamo dimostrato che la presenza anche di una sola cellula tumorale circolante identifica un sottogruppo di pazienti a più alto rischio di progressione di malattia [77]. Una successiva analisi, condotta su 27 pazienti candidati a terapia con bevacizumab, ha mostrato che l'assenza di CTC all'analisi con CellSearch<sup>®</sup> non necessariamente corrisponde ad un decorso favorevole della malattia e non sempre si associa a risposta alla terapia. Le conoscenze sul ruolo dell'ipossia nella progressione tumorale e le nuove evidenze sulla correlazione tra microambiente ipossico e induzione della transizione epitelio-mesenchima nelle cellule tumorali, ha indotto a ritenere che la terapia antiangiogenica possa avere un ruolo diretto sulla trasformazione fenotipica delle CTC e conseguentemente mascherarne la presenza. In un simile scenario, appare di notevole interesse la caratterizzazione delle cellule tumorali circolanti nei pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto, al fine di districare la complessità biologica della malattia, che sottende all'eterogeneità citogenetica delle CTC. In una logica progressione temporale, nella piena era dell'isolamento di cellule tumorali circolanti considerate per deduzione di natura epiteliale, abbiamo ritenuto di affiancare alla conta delle CTC mediante CellSearch<sup>®</sup> un sistema alternativo per l'isolamento delle cellule tumorali circolanti. Tale sistema (AdnaTest ColonCancerDetect/Select) è basato sulla combinazione di una fase di separazione immunomagnetica delle cellule mediante biglie coniugate con antigeni epiteliali specifici per malattia (EpCAM, EGFR e CEA) e di una seconda fase di selezione mediante RT-PCR per gli stessi marcatori sopra menzionati [78]. Un simile sistema ci ha consentito di

approfondire le conoscenze sull'espressione eterogenea di marcatori da parte delle CTC e di intuire la necessità di muovere verso metodi di isolamento antigene-indipendenti. In una serie di 39 pazienti affetti da carcinoma metastatico del colon-retto abbiamo confrontato la sensibilità dei due metodi di isolamento delle CTC, AdnaTest ColonCancer e CellSearch<sup>®</sup>. Abbiamo osservato una significativa discrepanza tra i due sistemi e una maggiore proporzione di pazienti positivi per la presenza di CTC all'analisi attraverso sistema AdnaTest ColonCancer (21% pazienti CTC-positivi con sistema CellSearch<sup>®</sup> vs 81% pazienti CTC-positivi con sistema AdnaTest ColonCancer). La maggiore sensibilità del metodo AdnaTest è attribuibile al pannello di marcatori utilizzato (EGFR, CEA ed EpCAM), che, sebbene comprenda solo marcatori di natura epiteliale, consente almeno di ovviare al limite della frequente sottoregolazione di EpCAM nelle cellule tumorali circolanti da carcinoma metastatico del colon-retto. A dimostrazione di ciò, la descrizione dettagliata dei marcatori espressi dalle CTC isolate con AdnaTest rivela che il marcatore maggiormente espresso è EGFR (81% dei campioni analizzati), seguito da CEA (48%) e solo per ultimo in ordine di frequenza da EpCAM (19%). In linea con le crescenti evidenze scientifiche a supporto della rilevanza del processo di transizione epitelio-mesenchimale nella biologia delle CTC e nella metastatizzazione dei tumori, il dato relativo alla inadeguatezza di EpCAM per l'arricchimento delle CTC in pazienti affetti da carcinoma metastatico del colon-retto ci ha indotto alla ricerca e alla sperimentazione di metodi alternativi per l'isolamento non EpCAM-dipendente delle CTC. Molte tecniche di isolamento delle CTC sono basate sulla cattura tramite anticorpi specifici per EpCAM, per la sua universale espressione nelle cellule di origine epiteliale e la sua assenza nelle cellule nucleate del sangue di origine leucocitaria. Nel 2009 per la prima volta, Maetzel e coll [79] hanno dimostrato l'esistenza di un clivaggio proteolitico di EpCAM, che comporta la traslocazione nucleare del suo dominio intracellulare e la conseguente attivazione di EpCAM come trasduttore di un segnale mitogenico. L'attivazione proteolitica di EpCAM, e la perdita del suo frammento extracellulare potrebbero fornire un razionale utile a spiegare il fallimento del CellSearch<sup>®</sup> nell'identificazione di CTC nel carcinoma del colon-retto, nel quale la proteolisi intramembranaria di EpCAM sembra evento piuttosto frequente. Come precedentemente discusso, l'isolamento di CTC da pazienti con carcinoma del colon mediante l'uso di metodiche EpCAM-dipendenti è inficiato dalla complessità biologica della malattia, rendendo necessaria l'adozione di sistemi di isolamento antigene-indipendenti. Aspetto cruciale che rende parzialmente ragione di tale complessità è il programma di transizione epitelio-mesenchima (EMT). In determinate condizioni, e con modalità contesto-dipendenti, le cellule tumorali possono attivare il programma EMT, che le

rende capaci di acquisire tratti caratteristici delle cellule staminali tumorali, come dimostrato inizialmente su cellule mammarie immortalizzate e successivamente in diversi tumori solidi. L'aberrante attivazione del programma EMT è caratteristica non solo delle cellule del tumore primitivo, ma anche delle CTC, nelle quali esso sembra svolgere alcune funzioni essenziali: incrementare la loro competenza metastatica, renderle capaci di eludere la sorveglianza immunitaria e la morte indotta dai farmaci, ed attivare un programma trascrizionale tipico delle cellule staminali tumorali. Studi recenti hanno suggerito che le cellule più prone ad acquisire i tratti delle cellule staminali non siano quelle che hanno completato il programma EMT, ma quelle con fenotipo ibrido epitelio-mesenchimale. I nostri dati ottenuti su pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto dopo fallimento della prima linea terapeutica dimostrano infatti che il marcatore di staminalità CD44v6, quando presente sulle CTC, è costantemente associato alla contemporanea espressione di marcatori epiteliali (CK20) e mesenchimali (N-caderina). Questi dati, che confermano quanto da noi ed altri osservato anche sul carcinoma mammario e prostatico, suggeriscono che l'induzione di una EMT parziale, più che di una EMT completa, consenta alle CTC di acquisire tratti staminali, o, in altre parole, che esista una cosiddetta "finestra staminale" situata a metà strada tra il fenotipo epiteliale e quello mesenchimale. Studi recenti hanno suggerito che solo queste CTC in stato "semi-mesenchimale", a differenza di quelle con fenotipo mesenchimale completo, siano dotate di quella straordinaria e complessa plasticità che le rende capaci di portare a termine efficacemente la cascata metastatica. Nel momento della "finestra staminale" le CTC acquisiscono, tra le altre caratteristiche, anche una signature genetica tipica delle cellule farmacosistenti, come abbiamo evidenziato in uno studio nel quale ci siamo prefissati come obiettivo primario quello di stabilire quali caratteristiche molecolari avessero le CTC isolate da pazienti con carcinoma del colon-retto resistenti alla chemioterapia. In questi pazienti infatti la contemporanea espressione di ALDH1 (marcatore di staminalità), di survivina (resistenza alla morte per apoptosi) e di MRP5 (canale di trasporto per fluorouracile e derivati del platino) rappresentava un profilo caratteristico delle CTC isolate dai pazienti in progressione di malattia in corso di trattamento chemioterapico, ma non di quelli in risposta. Nonostante sia noto che la via del segnale di Notch-Jagged è almeno parzialmente implicata nella genesi di CTC a fenotipo EMT parziale, le vie del segnale che regolano l'interazione tra EMT parziale e farmacosistenza non sono pienamente comprese. La presenza di un fenotipo ibrido epiteliale/mesenchimale è stata descritta, nel carcinoma del colon come in altre neoplasie, non solo in CTC singole, ma anche in CTC aggregate in cluster. Questi cluster, definiti anche "microemboli" sono frequentemente resistenti alla apoptosi, e la loro presenza

in circolo è associata a prognosi infausta. L'elevato potenziale metastatico dei cluster rispetto a quello delle CTC singole è stato ampiamente dimostrato in letteratura, e sembra dipendere dalla composizione stessa del cluster, nel quale le CTC (il "seed", secondo la teoria di Paget sulle metastasi) viaggiano portando con sé il "soil", diversi tipi cellulari presenti nel microambiente del tumore di origine. Tra le neoplasie caratterizzate da spiccata tendenza a rilasciare cluster, i tumori del tratto gastroenterico occupano senza dubbio un posto di rilievo. Studi su modelli murini hanno dimostrato che i cluster di CTC evidenziabili nella circolazione sanguigna non derivano dall'aggregazione di CTC singole, ma hanno origine oligoclonale e migrano dal tessuto tumorale primitivo alla circolazione sanguigna collettivamente. La migrazione di gruppi multicellulari, anche nota come invasione collettiva, si verifica se vengono mantenute, almeno in parte, le giunzioni intercellulari, in modo che le cellule restino aggregate tra loro durante la migrazione. Contestualmente, per intravasare e diffondere a distanza le cellule tumorali devono acquisire caratteristiche mesenchimali di motilità e invasività. I nostri dati dimostrano che la presenza di cellule con un simile fenotipo ibrido epiteliale/mesenchimale è frequente nei cluster isolati attraverso metodi di filtrazione non antigene-dipendenti dal sangue di pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto. È ipotesi plausibile che l'aggregazione in cluster delle cellule tumorali con fenotipo ibrido possa rappresentare la strategia di sopravvivenza delle cellule tumorali in circolo. La persistenza di alcuni tratti epiteliali, infatti, potrebbe garantire alle cellule di ricevere segnali di sopravvivenza ed evitare la morte per anoikis alla quale esse sarebbero destinate se viaggiassero come cellule singole epiteliali. D'altro canto, l'eterogeneità dei tipi cellulari che compongono i cluster potrebbe mantenere le cellule tumorali in circolo in un loro microambiente e consentire il reciproco adattamento del seed e del soil aumentandone le possibilità di sopravvivenza. Il modello che meglio può spiegare il dialogo tra cellule tumorali e microambiente è quello della plasticità e reciprocità, ideato da Friedl nel 2011 [80] e basato sul fatto che i cambiamenti nel fenotipo e nelle funzioni delle cellule tumorali sono indotti da segnali provenienti dal microambiente, rispetto al quale le cellule tumorali instaurano una reciproca comunicazione, necessaria perché l'ecosistema generato dal tumore si mantenga in equilibrio, nonostante la sua natura instabile, adattandosi alle variazioni del microambiente e a sua volta inducendo l'adattamento del microambiente alla sua continua evoluzione. L'ipossia connota trasversalmente il microambiente tumorale e rappresenta uno dei segnali più potenti di induzione della competenza metastatica e uno dei circuiti di interazione maggiormente attivi tra microambiente e cellule tumorali. HIF1- $\alpha$ , nello specifico, quando stabile in condizioni di ipossia, guida l'attivazione di un programma trascrizionale che coinvolge, tra gli

altri, i geni implicati nel processo di transizione epitelio-mesenchima, qualificandosi come regolatore chiave del fenotipo invasivo delle cellule tumorali. I nostri risultati mostrano l'espressione di HIF1- $\alpha$  in cellule tumorali circolanti con fenotipo ibrido epiteliale/mesenchimale singole o aggregate in cluster, a sostegno dell'ipotesi per cui i segnali di comunicazione tra cellule tumorali e microambiente non si arrestano in circolo, ma si mantengono e anzi si potenziano, nel corso della progressione tumorale. Alla luce di quanto discusso, appare chiaro che la biopsia liquida può rappresentare un valido strumento nella comprensione dei meccanismi biologici che regolano la progressione tumorale. E' peraltro vero che nell'era delle terapie biologiche e della individualizzazione delle cure, l'individuazione dei bersagli molecolari sulle cellule tumorali diventa una assoluta necessità. La caratterizzazione molecolare dei tumori è ormai parte integrante del percorso diagnostico-terapeutico in oncologia e il ruolo dei biomarcatori predittivi di risposta alle nuove terapie acquisisce progressiva importanza, anche in ragione dei costi elevati dei nuovi farmaci. E' evidenza degli ultimi anni il fatto che esista un significativo grado di eterogeneità intratumorale e che le vie molecolari che sostengono la crescita e la progressione dei tumori subiscano un'evoluzione costante, che difficilmente una biopsia tissutale può rappresentare fedelmente. In questo contesto si inserisce la rilevanza clinica di uno strumento come la biopsia liquida, che per sua stessa natura si pone come unico possibile mezzo per seguire in tempo reale l'evoluzione del profilo molecolare di un tumore. Il nostro primo approccio verso la caratterizzazione delle CTC per biomarcatori di comprovato significato clinico, ancora inconsapevole della necessità di isolare le cellule indipendentemente dall'espressione di marcatori epiteliali, è stato quello di analizzare lo stato mutazionale di *KRAS* nelle CTC di pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto. E' ormai noto da tempo che mutazioni a carico dei geni *KRAS*, *NRAS* e *BRAF* sono associate a resistenza innata e acquisita alle terapie anti-EGFR nel per cui lo stato mutazionale dei geni del pathway di RAS oggi guida la scelta terapeutica nei pazienti con carcinoma metastatico del colon-retto. La complessità di un sistema dinamico, come quello in cui cloni diversi di cellule tumorali sostengono nel tempo l'evoluzione clinica della malattia, può ragionevolmente essere monitorata attraverso la biopsia liquida. I risultati della nostra analisi hanno dimostrato che lo stato mutazionale del gene *KRAS* varia significativamente tra il tessuto tumorale e le cellule tumorali circolanti, a sostegno dell'idea che attraverso la biopsia liquida si possa monitorare, differentemente dal tessuto tumorale, l'evoluzione clonale del cancro. La rilevanza delle osservazioni presentate è confermata da una recente pubblicazione di Siravegna e coll, in cui si dimostra che attraverso l'analisi mutazionale del pathway di RAS su DNA tumorale libero circolante è possibile

tracciare l'effetto della pressione selettiva delle terapie anti-EGFR sui tumori metastatici del colon-retto. In particolare, lo studio offre una prova di concetto per la possibilità di adottare schedule intermittenti di terapie anti-EGFR, seguendo l'evoluzione dinamica dei tumori rivelata dalla biopsia liquida [14].

Il cancro è una patologia dai complessi tratti molecolari, dinamica e in continua evoluzione. Per rispettare la promessa di una medicina sempre più personalizzata, abbiamo bisogno di strumenti validi, affidabili e poco invasivi che in futuro possano essere di aiuto nella diagnosi precoce, nella stratificazione dei pazienti e nel monitoraggio della risposta ai trattamenti. La biopsia liquida, grazie alla sua capacità di individuare con tempismo non solo bersagli terapeutici innovativi, ma anche la “finestra” in cui le cellule sono più suscettibili ai farmaci, rappresenta senza dubbio uno di questi strumenti.

#### **4. ABBREVIAZIONI**

APC: Allophycocyanin

CEA: antigene carcino-embrionario

CK: citocheratina

CSC: cancer stem cells

CTC: cellule tumorali circolanti

ctDNA: DNA tumorale circolante

DAPI: 4'-6-Diamidino-2-phenylindole

DIOC: dihexyloxacarboeyanine iodide

DMEMF12: Modified Eagle Medium/F12 advanced Dulbecco

dNTP: deossiribonucleotidi

DTC: disseminated tumor cells

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFR: epidermal growth factor

EMT: Epithelial to Mesenchymal Transition

EPOCH: etoposide, prednisone, vincristina, ciclofosfamide, doxorubicina

FDA: Food and Drug Administration

FGF: Fibroblast Growth Factor

FITC: Fluorescein Isothiocyanate

GA733-2: antigene associato al tumore gastrointestinale

HIF-1 $\alpha$ : fattore 1 alfa ipossia inducibile

IF: immunofluorescenza

MAPK: mitogen-activated protein kinase

mCRC: metastatic colorectal cancer

mCRPC: metastatic castration-resistant prostate cancer

MET: Mesenchymal to Epithelial Transition

MRD: malattia minima residua

NGS: Next Generation Sequencing

NSCLC: carcinoma polmonare non a piccole cellule

PBS: phosphate buffered saline

PE: Phycoerythrin

PFS: progression free survival

PlGF: placental growth factor

RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

STR: Sensiscript Reverse Transcriptase

VEGF: vascular endothelial growth factor

VEGFR: vascular endothelial growth factor receptors

WGA: Whole Genome Amplification

## 5. REFERENZE

1. Jawed I, Wilkerson J, Prasad V, et al. Colorectal Cancer Survival Gains and Novel Treatment Regimens: A Systematic Review and Analysis. *JAMA Oncol.* 2015;1(6):787-95.
2. Fakih MG. Metastatic colorectal cancer: current state and future directions. *J Clin Oncol.* 2015;33(16):1809-24.
3. Ciombor KK, Wu C, Goldberg RM. Recent therapeutic advances in the treatment of colorectal cancer. *Annu Rev Med.* 2015;66:83-95.
4. Karapetis CS, Maru D, Waring P, et al. Incorporating traditional and emerging biomarkers in the clinical management of metastatic colorectal cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(8):1033-48.
5. Drucker E, Krapfenbauer K. Pitfalls and limitations in translation from biomarker discovery to clinical utility in predictive and personalised medicine. *EPMA J.* 2013;4(1):7.
6. Tran NH, Cavalcante LL, Lubner SJ, et al. Precision medicine in colorectal cancer: the molecular profile alters treatment strategies. *Ther Adv Med Oncol.* 2015;7(5):252-62.
7. de Gramont A, Watson S, Ellis LM, et al. Pragmatic issues in biomarker evaluation for targeted therapies in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015;12(4):197-212.
8. Camp ER, Ellis LM. CCR 20th Anniversary Commentary: RAS as a Biomarker for EGFR--Targeted Therapy for Colorectal Cancer-From Concept to Practice. *Clin Cancer Res.* 2015;21(16):3578-80.
9. Maru D, Venook AP, Ellis LM. Predictive biomarkers for bevacizumab: are we there yet? *Clin Cancer Res.* 2013;19(11):2824-7.
10. Michor F, Polyak K. The origins and implications of intratumor heterogeneity. *Cancer Prev Res (Phila).* 2010;3(11):1361-4.
11. McGranahan N, Favero F, de Bruin EC, et al. Clonal status of actionable driver events and the timing of mutational processes in cancer evolution. *Sci Transl Med.* 2015;7(283):283ra54.
12. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature.* 2012;481(7381):306-13.
13. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature.* 2013;501(7467):338-45.
14. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med.* 2015;21(7):827.

15. Walther V, Hiley CT, Shibata D, et al. Can oncology recapitulate paleontology? Lessons from species extinctions. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(5):273-85.
16. Hiley C, de Bruin EC, McGranahan N, et al. Deciphering intratumor heterogeneity and temporal acquisition of driver events to refine precision medicine. *Genome Biol*. 2014;15(8):453.
17. McGranahan N, Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell*. 2015;27(1):15-26.
18. Alizadeh AA, Aranda V, Bardelli A, et al. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat Med*. 2015;21(8):846-53.
19. Freidlin B, Korn EL. Biomarker enrichment strategies: matching trial design to biomarker credentials. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(2):81-90.
20. Jamal-Hanjani M, Quezada SA, Larkin J, et al. Translational implications of tumor heterogeneity. *Clin Cancer Res*. 2015;21(6):1258-66.
21. Pantel K, Speicher MR. The biology of circulating tumor cells. *Oncogene*. 2015 Jun 8. doi: 10.1038/onc.2015.192.
22. Ma M, Zhu H, Zhang C, et al. Liquid biopsy"- ctDNA detection with great potential and challenges. *Ann Transl Med*. 2015 Sep;3(16):235.
23. Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov*. 2014 Jun;4(6):650-61.
24. Salvianti F, Pazzagli M, Pinzani P. Single circulating tumor cell sequencing as an advanced tool in cancer management. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015 Nov 26:1-13.
25. Raimondi C, Gradilone A, Gazzaniga P. Controversies in circulating tumor cell count during therapy. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013 Jun;13(5):499-507.
26. Yap TA, Lorente D, Omlin A, et al. Circulating tumor cells: a multifunctional biomarker. *Clin Cancer Res*. 2014 May 15;20(10):2553-68.
27. Krebs MG, Hou JM, Ward TH, et al. Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. *Ther Adv Med Oncol*. 2010 Nov;2(6):351-65.
28. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem*. 2015 Jan;61(1):112-23.
29. Sundaresan TK, Sequist LV, Heymach JV, et al. Detection of T790M, the acquired resistance EGFR mutation, by tumor biopsy versus noninvasive blood-based analyses. *Clin Cancer Res*. 2015 Oct 7. pii: clincanres.1031.2015.
30. Van Emburgh BO, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Acquired resistance to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer. *Mol Oncol*. 2014 Sep 12;8(6):1084-94.

31. Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014 Feb 20;32(6):579-86.
32. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014 Feb 19;6(224).
33. Huang L, Fu L. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharm Sin B*. 2015 Sep;5(5):390-401.
34. De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. *Ann Oncol*. 2014 Sep;25(9):1729-35.
35. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol*. 2015 May;16(5):541-9.
36. AJCC 2010
37. Magbanua MJ, Das R, Polavarapu P, et al. Approaches to isolation and molecular characterization of disseminated tumor cells. *Oncotarget*. 2015 Oct 13;6(31):30715-29.
38. Stoecklein NH, Fischer JC, Niederacher D, et al. Challenges for CTC-based liquid biopsies: low CTC frequency and diagnostic leukapheresis as a potential solution. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015 Nov 20.
39. Williams ES, Rodriguez-Bravo V, Chippada-Venkata U, et al. Generation of Prostate Cancer Patient Derived Xenograft Models from Circulating Tumor Cells. *J Vis Exp*. 2015 Oct 20;(105). doi: 10.3791/53182.
40. Cayrefourcq L, Mazard T, Joosse S, et al. Establishment and characterization of a cell line from human circulating colon cancer cells. *Cancer Res*. 2015 Mar 1;75(5):892-901.
41. Gao D, Vela I, Sboner A, et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell*. 2014 Sep 25;159(1):176-87.
42. Alberter B, Klein CA, Polzer B. Single-cell analysis of CTCs with diagnostic precision: opportunities and challenges for personalized medicine. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015 Nov 15.
43. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*. 1995;154(1):8-20.
44. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(3):178-96.
45. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(6):442-54.

46. Yu M, Bardia A, Wittner BS, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*. 2013;339(6119):580-4.
47. Thiery JP, Lim CT. Tumor dissemination: an EMT affair. *Cancer Cell*. 2013;23(3):272-3.
48. Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell*. 2014;158(5):1110-22.
49. Aceto N, Toner M, Maheswaran S, et al. En Route to Metastasis: Circulating Tumor Cell Clusters and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Trends in Cancer*. 2015; 1(1):44-52.
50. Friedl P, Locker J, Sahai E, et al. Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol*. 2012;14(8):777-83.
51. Wong IY, Javaid S, Wong EA, et al. Collective and individual migration following the epithelial-mesenchymal transition. *Nat Mater*. 2014;13(11):1063-71.
52. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell*. 2011;20(5):576-90.
53. Jolly MK, Huang B, Lu M, et al. Towards elucidating the connection between epithelial-mesenchymal transitions and stemness. *J R Soc Interface*. 2014;11(101):20140962.
54. Joosse SA, Gorges TM, Pantel K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Mol Med*. 2014;7(1):1-11.
55. 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(19):3213–3221.
56. Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, et al. Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2009;20(7):1223–1229.
57. Sastre J, Maestro ML, Gómez-España A, et al. Circulating tumor cell count is a prognostic factor in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy plus bevacizumab: a Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors study. *Oncologist*. 2012;17(7):947–955.
58. Tol J, Koopman M, Miller MC, et al. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. *Ann Oncol*. 2010;21(5):1006–1012.

59. Bidard FC, Ferrand FR, Huguet F, et al. Disseminated and circulating tumor cells in gastrointestinal oncology. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012;82(2):103-15.
60. Molnar B, Ladanyi A, Tanko L, et al. Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2001 Dec;7(12):4080-5.
61. Gosens MJ, van Kempen LC, van de Velde CJ, et al. Loss of membranous EpCAM in budding colorectal carcinoma cells. *Mod Pathol*. 2007;20(2):221-32.
62. Dan Liu, Jinghua Sun, Jinming Zhu, et al. Expression and clinical significance of colorectal cancer stem cell marker EpCAMhigh/CD44+ in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2014; 7(5): 1544–1548.
63. Laetitia Marisa, Aurélien de Reyniès, Alex Duval, et al. Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. *PLoS Med*. 2013 May; 10(5).
64. Shelygin YA, Pospekhova NI, Shubin VP, et al. Epithelial-mesenchymal transition and somatic alteration in colorectal cancer with and without peritoneal carcinomatosis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:629496.
65. Lou XL, Sun J, Gong SQ, et al. Interaction between circulating cancer cells and platelets: clinical implication. *Chin J Cancer Res*. 2015 Oct;27(5):450-60.
66. Kim AY, Kwak J, Je N, et al. Epithelial-mesenchymal Transition is Associated with Acquired Resistance to 5-Fluorouracil in HT-29 Colon Cancer Cells. *Toxicol Res*. 2015 Jun; 31(2): 151–156.
67. Takebe N, Miele L, Harris PJ, et al. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt in cancer stem cells: clinical update. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2015 Aug;12(8):445-64.
68. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
69. MacDonald IC, Groom AC, Chambers AF. Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models. *Bioessays*. 2002 Oct;24(10):885-93.
70. Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell*. 2013 May 13;23(5):573-81.
71. Simon A Joosse, Tobias M Georges, Klaus Pantel. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. *EMBO Molecular Medicine*. 2015 Jan;7:1-11.
72. Parkinson DR, Dracopoli N, Petty BG et al. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J Transl Med*. 2012 Jul 2;10:138.

73. Alix-Panabières C, Pantel K. Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip*. 2014 Jan 7;14(1):57-62.
74. 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.
75. Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2014 Apr;15(4):406-14.
76. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004 Aug 19;351(8):781-91.
77. Gazzaniga P, Raimondi C, Gradilone A et al. Circulating tumor cells in metastatic colorectal cancer: do we need an alternative cutoff? *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Aug;139(8):1411-6.
78. Lankiewicz S, Zimmermann S, Hollmann C, et al. Circulating tumour cells as a predictive factor for response to systemic chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Mol Oncol*. 2008 Dec;2(4):349-55.
79. Maetzel D, Denzel S, Mack B et al. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol*. 2009 Feb;11(2):162-71.
80. Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell*. 2011 Nov 23;147(5):992-1009.