

Applicazioni diagnostiche e prognostiche del DNA libero circolante nel plasma

Lo screening prenatale non invasivo e la biopsia liquida

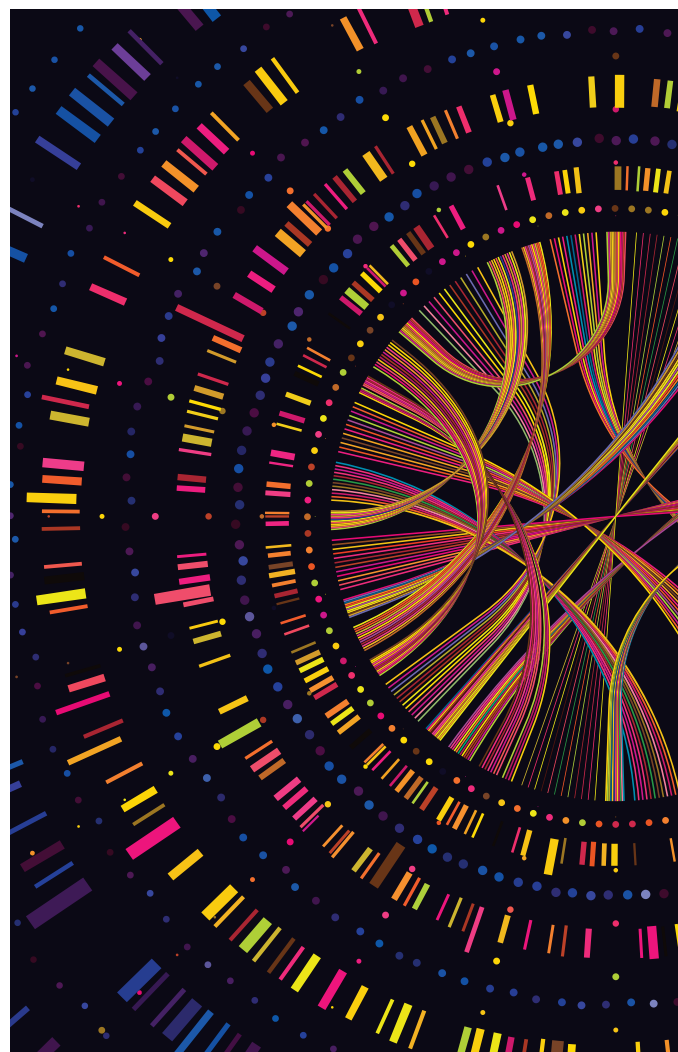
Nel 1948, la presenza di molecole di DNA libero da cellule (cfDNA, cell free DNA) fu per la prima volta scoperta da Mandel e Metais nei sieri di pazienti affetti da cancro (Mandel and Metais, 1948).

Successivamente, l'osservazione che pazienti affetti da patologie tumorali (Bendich et al., 1965) o autoimmuni (Tan et al., 1966) mostravano livelli diversi di DNA libero circolante nel siero, riaccese l'interesse per il cfDNA come biomcatore non invasivo di una varietà di malattie. Il cfDNA viene rilasciato da ogni tipo di cellula di un individuo e, per questo motivo, possiede una natura chimerica, caratteristica che per lungo tempo ha limitato le possibilità di indagine della piccola proporzione di cfDNA proveniente dalle cellule che devono essere indagate. Solamente negli anni '90 i progressi tecnologici hanno infatti consentito il rilevamento riproducibile del cfDNA permettendo quindi di esplorare il suo potenziale prognostico e diagnostico sia in condizioni fisiologiche (rilevamento di cfDNA di derivazione fetale durante la gravidanza), che patologiche (ad esempio tumori e patologie cardiovascolari).

TEST PRENATALE NON INVASIVO

(NIPT, non invasive prenatal test). La prima applicazione del cfDNA come biomcatore non invasivo in epoca prenatale, fu introdotta da Dennis Lo nell'Università di Hong Kong. Nel 1997 infatti Dennis Lo fu in grado di rilevare il sesso ed il gruppo sanguigno RhD fe-

tale a partire da un prelievo di sangue materno mediante una PCR real time (Lo et al., 1997). Successivamente si tentò, ma senza grande successo, di applicare la stessa tecnica per rilevare alterazioni del numero dei cromosomi fetali. La vera svolta avvenne nel 2011, quando fu pubblicato il primo articolo sulla determinazione della trisomia 21 fetale mediante un sequenziamento massivo parallelo (MPS, massively parallel sequencing) del cfDNA estratto da plasma materno (Chiu et al., 2011). Questa osservazione aprì la porta alle applicazioni del MPS nella ricerca di aneuploidie fetali su DNA libero dalle cellule proveniente dalla placenta e circolante nel sangue materno. Con questo approccio, tutte le molecole di DNA circolante contenute in un campione di plasma materno vengono sequenziate. Quindi, allo scopo di identificare alterazioni del numero di copie di un cromosoma (ad esempio, il cromosoma 21) la proporzione di sequenze del cromosoma di interesse viene confrontata, mediante analisi bioinformatiche, con il numero di sequenze prodotte per tutti gli altri cromosomi. Il vantaggio di questo approccio è che il sequenziamento riguarda tutto il genoma e pertanto, può potenzialmente essere applicato per la ricerca di alterazioni di tutti i cromosomi. Ad oggi però, i dati pubblicati indicano risultati estremamente buoni per l'identificazione della trisomia 21, della trisomia 18 e della trisomia 13. Per queste alterazioni cromosomiche infatti, i tassi di rilevamento ottenuti analizzando grandi casistiche con tecnologie di MPS diverse hanno riportato una sensibilità e specificità vicine al 100% (Gil et al., 2017). Di seguito vengono elencati i fattori che

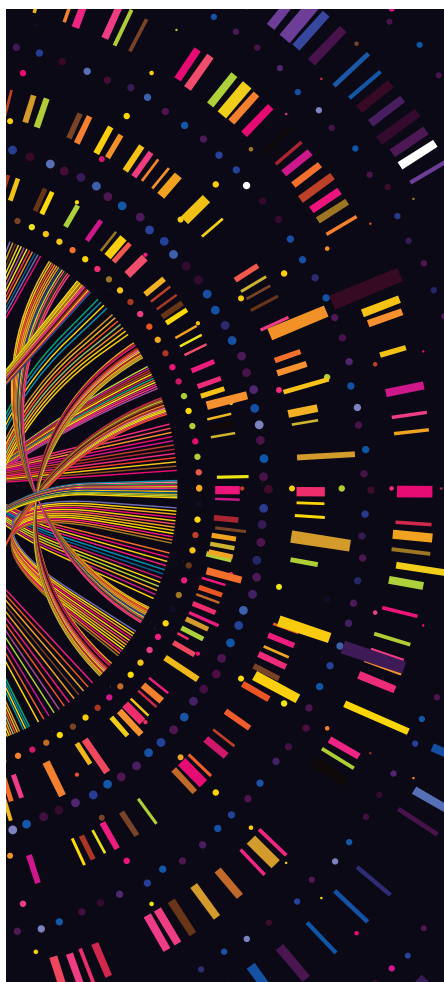


IRENE BOTTILLO
Specialista in
Genetica Medica -
Dottore di Ricerca
in Genetica
Medica UOC
Laboratorio di
Genetica Medica -
Università La
Sapienza -
Azienda
Ospedaliera San
Camillo-Forlanini

maggiormente condizionano i risultati di un test NIPS.

Frazione fetale. Il sangue materno contiene molecole di cfDNA che provengono per il 90-95% dalle cellule della madre, e per il 5-10% dalle cellule placentari. La quantità di cfDNA fetale nel sangue materno (anche chiamata Frazione Fetale, FF) varia infatti durante il corso della gravidanza: aumenta all'aumentare delle settimane di gestazione ed è massima al momento del parto (Wang et al., 2013). Considerate le attuali tecnologie di sequenziamento, i protocolli di analisi consentono il rilevamento del DNA fetale libero circolante solo quando la FF è almeno del 4-5%. Questi livelli di frazione fetale si raggiungono in media per le donne in gravidanza a partire dalla decima settimana di gestazione. La frazione fetale La FF è inoltre influenzata da diverse caratteristiche della madre, tra cui il peso: l'aumento del peso materno è associato a una minore percentuale di DNA fetale (Wang et al., 2013).

Gravidanze multiple. Quando una gravidanza gemellare è moncoriale (e quindi monozygotica), i feti saranno o entrambi portatori o entrambi non por-



tatori di un'anomalia cromosomica. In questo scenario il NIPT è possibile e non presenta criticità. Tuttavia, quando i gemelli sono dicorionici, la presenza di anomalie genetiche può essere discordante tra i due feti. Il NIPT per l'identificazione di aneuploidie cromosomiche in almeno uno dei due feti e' comunque possibile ma l'analisi bioinformatica risulta più complessa. Attualmente inoltre rimangono alcuni interrogativi, uno dei quali riguarda lo scenario in cui un feto in una gravidanza gemellare dizigotica abortisce (gravidanza con un gemello riassorbito); ad oggi non è chiaro il contributo del DNA del gemello riassorbito sul totale del cfDNA nel plasma materno. La complessità delle gravidanze gemellari suggerisce pertanto che, prima del test NIPT, è indicato eseguire un'ecografia per rilevare eventuali sacche di gravidanza vuote e per determinare la corionicità dei feti. In caso di NIPT positivo, questo test comunque non indica quale gemello sia portatore dell'anomalia cromosomica.

Mosaicismo placentare. È stato dimostrato che la fonte del cfDNA fetale sia la placenta (Alberry et al., 2007) ed è noto come, in questo tessuto, possano essere presenti linee cellulari che presentano anomalie cromosomiche che

non sono presenti nel feto, un fenomeno spesso chiamato "mosaicismo placentare". Questo è uno dei motivi per cui, a seguito di un test NIPT positivo, viene richiesta la conferma del risultato mediante un test invasivo (i.e. amniocentesi).

Fattori materni. Anomalie genetiche materne, tra cui il mosaicismo cromosomico o la presenza di una forma tumorale, potrebbero, in rari casi, spiegare la positività ad un test NIPT e l'assenza di anomalie cromosomiche nel rispettivo prelievo di cellule da liquido amniotico.

Interpretazione del risultato. Il NIPT, in quanto screening genetico, produce un risultato che presenta un rischio residuo (ad es. il rischio che il feto sia portatore di una condizione genetica anche se il test e' risultato negativo). Come tutti i test genetici, anche il NIPT deve pertanto essere preceduto e seguito da una consulenza genetica e dalla firma di un consenso informato.

BIOPSIA LIQUIDA

Nei decenni successivi alla scoperta del DNA libero circolante, numerosi studi hanno dimostrato che i pazienti oncologici presentano generalmente livelli di cfDNA più alti rispetto ai soggetti non affetti (Fleischhacker and Schmidt, 2007). Nel 1989, Stroun e colleghi dimostrarono che una frazione del cfDNA presente nel plasma dei pazienti oncologici deriva da cellule tumorali (Stroun et al., 1989). Studi successivi non solo hanno confermato che le cellule tumorali rilasciano quantità rilevabili di frammenti di cfDNA nel circolo sanguigno ed in altri fluidi biologici, ma hanno anche rivelato che questi frammenti sono portatori delle alterazioni genetiche ed epigenetiche caratteristiche del tumore da cui hanno origine (Wan et al.,

“
La biopsia liquida trova oggi massimo impiego nel carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), un tumore che si distingue in molteplici sottotipi genetici ognuno caratterizzato da mutazioni che costituiscono un bersaglio molecolare per la terapia

2017). Questi studi dimostrarono che la determinazione del profilo molecolare del cfDNA può rivestire un ruolo utile nella gestione "non invasiva" del tumore. Tale osservazione, unita all'avvento delle nuove tecnologie al servizio della genetica molecolare, ha catalizzato le ricerche sulla correlazione tra le caratteristiche del cfDNA e tipi tumorali. La biopsia liquida in pazienti oncologici si esegue mediante un prelievo di sangue dal cui plasma viene estratto il cfDNA. Le indagini che vengono condotte mirano allo studio di mutazioni del DNA tumorale circolante (ctDNA) in grado di conferire sensibilità o resistenza alle terapie a bersaglio molecolare (Siravegna et al., 2015). In questo scenario, il sequenziamento massivo parallelo permette, in un unico esperimento, sia di testare la presenza di mutazioni già note, che di identificare altre alterazioni per le quali il paziente possa essere inserito in sperimentazioni cliniche. L'MPS inoltre consente di quantificare la "frequenza dell'allele mutato" (VAF, variant allele frequency), un parametro rilevante per monitorare l'evoluzione del tumore nei pazienti in corso di trattamento (Abbosh et al., 2017). La biopsia liquida trova oggi massimo impiego nel carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), un tumore che si distingue in molteplici sottotipi genetici ognuno caratterizzato da mutazioni che costituiscono un bersaglio molecolare per la terapia (Rolfo et al., 2018). Le più comuni sono le alterazioni del recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR), bersaglio dei farmaci inibitori della proteina tirosina-chinasi (TKI) ed identificate nel 10-30% dei pazienti NSCLC. Una delezione di 5 aminoacidi nell'esone 19 e le sostituzioni L858R e L861Q sono state associate all'efficacia degli EGFR-TKI, mentre la sostituzione T790M induce resistenza agli EGFR-TKI (Mountzios, 2018). L'approvazione dei TKI di prima generazione è stata seguita dallo sviluppo di TKI di seconda e terza generazione, rivolti a specifiche mutazioni di resistenza di EGFR (Mountzios, 2018); TKI di quarta generazione sono attualmente in studio (Jia et al., 2016).

Attualmente l'impiego della biopsia liquida a scopi di diagnosi predittiva per il trattamento farmacologico è circoscritto a pazienti affetti da NSCLC, per la ricerca delle mutazioni di EGFR solo se la biopsia tissutale risulti non effettuabile o non idonea o solo in caso di franca recidiva di malattia (EMA. Guideline on good pharmacogenomic practice. 2016).