Guida all'uso clinico dei biomarcatori in oncologia: le prospettive

Massimo Gion[1], Chiara Trevisiol[1,2], Silvia Pregno[3], Aline S.C. Fabricio[1,2] a nome dei Gruppi e Comitati di Progetto della Guida*

[1]Centro Regionale Biomarcatori, U.O. Laboratorio Analisi, Dipartimento di Patologia Clinica, Azienda ULSS 12 Veneziana, [2]Fondazione ABO, Venezia

[3]GRADE Working Group, Cochrane Methodology Review Group, Castelvetro di Modena, MO

**L'elenco completo di tutti gli Autori e Collaboratori della Guida è pubblicato su Biochim Clin 2011;35:91-3.*

ABSTRACT

Guidelines for clinical use of biomarkers in oncology: an outlook. Although much information has recently been accumulated in the field of biomarkers, no new markers have been approved by the U.S. Food and Drug Administration for clinical use over the last two decades. This fact emphasizes the need to strengthen translational research in order to select, evaluate, and validate the most promising biomarkers in a reliable and efficient manner. The most innovative development regarding traditional markers is in their dynamic assessment in the diagnostic scenario. This approach is under evaluation for several biomarkers, e.g. PSA for prostate cancer and CA 125 for ovarian cancer. On the other hand, new biomarkers are under study. Some promising biomarkers, such as the antibody immune response indicators, mechanism and/or microenvironment associated markers, and circulating tumour cells, are already in the validation phase. Even if they have preliminarily demonstrated very high potential, there is however insufficient evidence to support their definitive clinical use.

ABBREVIAZIONI E ACRONIMI UTILIZZATI

Parametri ematochimici

5-HIAA	Acido idrossiindolacetico
AbTg	Anticorpi anti-tireoglobulina
ACTH	Ormone adrenocorticotropo
AFP	α-fetoproteina
CA 15.3	Antigene carboidratico 15.3
CA 19.9	Antigene carboidratico 19.9
CA 27.29	Antigene carboidratico 27.29
CA 125	Antigene carboidratico 125
CEA	Antigene carcinoembrionario
CgA	Cromogranina A
Ct	Calcitonina
CTC	Cellule tumorali circolanti
DHEA-S	Deidroepiandrosterone solfato
ECD HER2	Dominio extracellulare di HER2
HAMA	Anticorpi umani anti-immunoglobulina murina
hCG e β-hCG	Gonadotropina corionica umana e subunità β
HER2	Recettore umano per il fattore di crescita epidermico 2
IgM	Immunoglobuline M
LDH	Lattato deidrogenasi
MIA	Melanoma inhibitory activity
MUC-1	Mucin 1 (cell surface associated mucin)
NSE	Enolasi neurone specifica
PAP	Fosfatasi acida prostatica
PSA	Antigene prostatico specifico
PSA L/T	Rapporto PSA libero su PSA totale
SCCA	Squamous cell carcinoma-associated antigen
Tg	Tireoglobulina
TSH	Ormone tireostimolante
VEGF	Fattore di crescita vascolare endoteliale
VES	Velocità di eritrosedimentazione
VIP	Peptide intestinale vasoattivo

Organizzazioni, Società, Gruppi cooperativi

ACCP	American College of Chest Physicians
ACN	Australian Cancer Network
ACOG	American College of Obstetricians and Gynecologists
ACS	American Cancer Society
AGREE	Appraisal of Guidelines for Research and Evaluation
AHRQ	Agency for Healthcare Research and Quality
AIOM	Associazione Italiana di Oncologia Medica
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ATA	American Thyroid Association
EMEA	European Medicines Agency
ESMO	European Society for Medical Oncology
GRADE	Grading of Recommendations Assessment, Development, and Evaluation
NACB	National Academy of Clinical Biochemistry

Corrispondenza a: Massimo Gion, Centro Regionale Biomarcatori, U.O. Laboratorio Analisi, Dipartimento di Patologia Clinica, Azienda ULSS 12 Veneziana, Campo Santi Giovanni e Paolo, 30122 Venezia. Tel. 0415294260, Fax 0415294910, E-mail massimo.gion@ulss12.ve.it

NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NGC	National Guideline Clearinghouse
NICE	National Institute for Health and Clinical Excellence
SIGN	Scottish Intercollegiate Guidelines Network
SNLG	Sistema Nazionale Linea Guida

Miscellanea

CAS	Chemical abstract service
CC	Consensus conference
CRM 457	Human thyroglobulin reference material 457
DT	Tempo di raddoppio
EBG	Linea guida evidence-based
EBM	Evidence-based medicine
ER	Esplorazione rettale
FMTC	Carcinoma midollare tiroideo familiare
FNAC	Fine needle aspiration cytology
HCC	Epatocarcinoma
HTA	Health technology assessment
IRP	International reference preparation
LG	Linea guida
LoE	Level of evidence
MTC	Carcinoma midollare della tiroide
NEBG	Linea guida non evidence-based
NSCLC	Tumore non a piccole cellule del polmone
NSGCT	Tumori germinali non seminomatosi del testicolo
PCR	Reazione a catena della polimerasi
PET	Tomografia a emissione di positroni
Qaly	Quality adjusted life years
RMI	Risk of malignancy index
RT-PCR	Reazione a catena della polimerasi in tempo reale
SCLC	Tumore a piccole cellule del polmone
SI	Standard internazionale
SoR	Strength of recommendation
TAC	Tomografia assiale computerizzata

LA VALUTAZIONE DINAMICA

Nel campo dei marcatori tradizionali la prospettiva più interessante è la valutazione dinamica dei marcatori su prelievi seriati con finalità diagnostiche. L'interesse verso tale approccio è stato motivato dai limiti ormai universalmente condivisi di sensibilità e specificità dei biomarcatori. Studi prospettici ed estensivi sul PSA hanno infatti dimostrato che non esiste un valore soglia sotto il quale possa essere esclusa la presenza di un carcinoma invasivo in quanto una percentuale significativa (intorno al 20%-25%) di uomini con neoplasie invasive iniziali della prostata presentano valori di PSA <3 μg/L. Inoltre, è altrettanto ben dimostrato che valori superiori al limite superiore di riferimento di numerosi biomarcatori possono frequentemente essere dovuti a ragioni non oncologiche.

Numerosi gruppi di ricerca hanno così iniziato a registrare nel tempo le concentrazioni dei biomarcatori nella singola persona studiando poi le variazioni con diversi algoritmi. Tale approccio è stato applicato abbastanza estensivamente per lo studio del PSA negli uomini e la variazione del PSA nel tempo, denominata "PSA velocity", è stata oggetto di numerosi studi che hanno portato a risultati in parte contraddittori. Le ricerche che hanno mostrato risultati più promettenti evidenziano come la "PSA velocity" presenti buone caratteristiche diagnostiche, identificando le persone con maggior rischio di sviluppare la neoplasia con anticipo rispetto al superamento del valore soglia. Inoltre, un più rapido incremento della "PSA velocity" predirebbe nei pazienti che sviluppano la neoplasia un tumore più aggressivo e quindi una prognosi peggiore. La variazione nel tempo dei valori per finalità diagnostiche è allo studio anche per il CA 125 in progetti pilota di screening del carcinoma dell'ovaio.

Complessivamente, la valutazione dei biomarcatori su prelievi seriali nella singola persona ha un buon razionale biologico, in quanto ci si aspetta che la produzione e la cinetica di rilascio del biomarcatore da parte del tessuto tumorale siano accelerate rispetto a quelle dei tessuti non neoplastici e portino a un progressivo incremento delle concentrazioni circolanti del marcatore. Inoltre, dal punto di vista clinico, lo studio della variazione nella singola persona svincolerebbe dalla necessità di fare riferimento a un valore soglia positivo/negativo arbitrario e potrebbe consentire di rilevare variazioni "patologiche" anche quando il valore del biomarcatore è ancora all'interno del cosiddetto "intervallo di normalità".

Per contro, l'impiego di tale approccio è ancora limitato dallo scarso livello di standardizzazione e soprattutto dalla carenza di informazioni sistematiche nelle persone sane sulla variabilità dei biomarcatori, sia spontanea che legata a variabili fisiologiche. Nell'attesa di ricerche di trasferimento finalizzate a ottenere queste informazioni, la valutazione di marcatori su prelievi seriali a fini diagnostici non può essere ancora considerata per l'applicazione clinica.

NUOVE CATEGORIE DI BIOMARCATORI

Altre promettenti prospettive stanno emergendo grazie alla identificazione di nuove categorie di biomarcatori. Negli ultimi decenni la ricerca oncologica ha portato a conoscenze molto approfondite sulla cellula tumorale e sui meccanismi di regolazione, dimostrando che il cancro è una malattia su base genetica che per svilupparsi e progredire richiede l'interazione coordinata di diversi "sistemi biomolecolari", ognuno caratterizzato dalla espressione di un numero veramente molto elevato di molecole di segnale, spesso ridondanti. La comunità scientifica ha così avuto la possibilità di identificare e studiare numerosi biomarcatori partendo da un razionale diverso dal classico approccio di "antigeni tumore-associati".

Inoltre, tra le nuove conoscenze, un concetto che è stato approfondito di recente è la relazione del tumore con il suo microambiente. Il microambiente viene costituito dallo stroma (cellule residenti non cancerose - fibroblasti, cellule endoteliali; tessuto connettivo e

matrice extracellulare), da un apparato microvascolare e da cellule dell'immunità innata, che comprendono macrofagi, granulociti neutrofili, basofili e mastociti. All'inizio la ricerca era focalizzata principalmente alla comprensione della trasformazione delle cellule sane in neoplastiche, ma negli ultimi anni è diventato evidente che altri componenti del tessuto neoplastico, tra cui cellule residenti non cancerose (fibroblasti, cellule endoteliali), tessuto connettivo e matrice extracellulare sono ugualmente importanti sia nello sviluppo iniziale che nella progressione tumorale. Infatti, il microambiente riveste un ruolo primario nel regolare la progressione di malattia. Il microambiente tumorale è un tessuto molto dinamico ed eterogeneo, ove la cellula neoplastica è in continua interazione con lo stroma e le componenti cellulari della risposta infiammatoria, mediante il rilascio di proteine solubili come fattori di crescita, citochine, chemochine e proteasi. Così, il livello di complessità delle interazioni molecolari è ulteriormente amplificato dalla partecipazione ai meccanismi regolatori del tumore di numerosi tipi cellulari o componenti tessutali normali o flogistici che coesistono con le cellule neoplastiche nel tessuto tumorale.

Un'ulteriore variabile che incrementa la complessità del sistema è la variazione qualitativa e quantitativa nel corso del tempo del grado di attivazione dei diversi "sistemi biomolecolari" di regolazione, che include sia la modulazione quantitativa o il silenziamento di sistemi attivi, sia l'attivazione di sistemi ridondanti precedentemente silenti; gli interventi terapeutici contribuiscono in modo rilevante alla attivazione o alla amplificazione di quest'ultimo meccanismo di variabilità biomolecolare.

Tale complessità ha come conseguenza la difficoltà al trasferimento alla pratica clinica di nuovi biomarcatori. A dispetto dell'esplosione di nuove conoscenze nell'ambito della biologia del tumore, biologia molecolare, genetica e immunologia, le raccomandazioni delle LG da noi esaminate non portano novità riguardo il possibile impiego in clinica di nuovi esami scoperti con tali tecnologie innovative sulla base delle nuove conoscenze. Una nota pubblicata il 12 agosto 2010 dal "Journal of the National Cancer Institute" conferma il fatto che nessun nuovo importante biomarcatore è stato approvato dalla "Food and Drug Administration" (FDA) nelle ultime due decadi per utilizzo clinico. Questa situazione contrasta nettamente con la pletora di informazioni biologiche e di nuovi potenziali biomarcatori resi disponibili proprio nelle ultime due decadi e mette in rilevo la necessità critica di potenziare la ricerca di trasferimento al fine di selezionare in base a priorità i biomarcatori relativi ai quesiti clinici ritenuti strategici e validarli rapidamente e affidabilmente per l'uso clinico.

Tra i nuovi biomarcatori non ancora validati per l'uso clinico, vale la pena di citare alcune delle categorie che potrebbero nei prossimi anni offrire prospettive innovative nel panorama dei marcatori circolanti. Le linee di ricerca più promettenti su nuovi marcatori si sono sviluppate principalmente in due direzioni: su alcuni tipi di marcatori solubili e su componenti rilasciate nel sangue dal tessuto neoplastico, inclusi acidi nucleici, esosomi e cellule tumorali.

Marcatori solubili

Fra i nuovi marcatori solubili allo studio due categorie sembrano particolarmente promettenti: gli indicatori di risposta immune dell'ospite ad antigeni espressi dal tumore ed i "marcatori di meccanismo".

Indicatori di risposta immune dell'ospite

Includono sia gli immunocomplessi circolanti, che autoanticorpi prodotti contro proteine tumore-specifiche. Un certo interesse hanno mostrato gli anticorpi contro mucine prodotte prevalentemente dal tumore (anticorpi anti-MUC1) e contro proteine codificate da oncogeni e geni oncosoppressori iperespressi o mutati (anticorpi anti-ciclina B1, anticorpi anti-HER2, anticorpi anti-p53). Recentemente, gli immunocomplessi circolanti, conosciuti da molti anni e studiati con alterne fortune, hanno riscontrato un rinnovato interesse grazie alla identificazione di immunoglobuline IgM complessate con marcatori noti (AFP, SCCA, PSA, CEA). In particolare, gli immunocomplessi SCCA-IgM e CEA-IgM hanno mostrato in studi preliminari, rispettivamente sull'epatocarcinoma e sul cancro del colon, buone caratteristiche di sensibilità e specificità per le neoplasie iniziali. Inoltre, questi complessi sembrano dare indicazioni diagnostiche indipendenti da quelle dei marcatori tradizionali presenti nei complessi, aprendo la prospettiva per un approccio multimarcatore. Gli studi su questi marcatori, che possono rappresentare un segnale di esposizione di antigeni tumorali, non hanno però ancora raggiunto risultati che possano essere trasferiti all'applicazione clinica.

Marcatori di meccanismo

Si tratta di una categoria che comprende molecole associate a diversi processi biologici. Fra i più conosciuti, le proteine circolanti codificate da oncogeni e geni oncosoppressori, i marcatori associati ai meccanismi di angiogenesi, le proteasi e gli specifici inibitori, i marcatori di infiammazione.

Tra i marcatori di infiammazione possiamo citare le citochine, che rappresentano una vasta famiglia di proteine e peptidi con azioni pro- o anti-infiammatorie, e includono interleuchine, chemochine, interferoni, fattori di crescita ematopoietici ed endoteliali e la famiglia dei "tumor necrosis factor" (TNF). Queste molecole, prodotte dalle cellule effettrici dell'immunità innata e acquisita e dal tumore stesso, sono in grado di orchestrare il microambiente infiammatorio tumorale, spostando l'equilibrio o verso un fenotipo protumorale, associato a rimodellamento tessutale, angiogenesi, immunosoppressione e induzione alla crescita, o verso un fenotipo antitumorale. Quindi le citochine coinvolte nell'infiammazione cancro-associata potrebbero rappresentare dei bersagli per nuove strategie diagnostiche e terapeutiche, mirate a rimodulare il microambiente tumorale.

L'angiogenesi, che consiste nella formazione di nuovi

vasi dall'endotelio della vascolatura già esistente, è fondamentale per la crescita, la progressione e la metastasi tumorale e viene governata dal bilancio tra fattori stimolatori e inibitori. Le cellule del sistema immunitario che, come descritto prima, sono reclutate e attivate dalle stesse cellule neoplastiche, giocano anche un ruolo chiave nella promozione dell'angiogenesi.

Il VEGF-A e i suoi recettori costituiscono la via regolatoria dominante per l'angiogenesi tumorale. In studi clinici randomizzati, l'anticorpo umanizzato anti-VEGF-A porta a un incremento della sopravivenza globale in pazienti affetti da tumori al colon quando combinato alla chemioteria convenzionale. Questo dato suggerisce che in futuro l'inibizione dell'angiogenesi potrà rappresentare un'efficace strategia antitumorale e che il VEGF potrà essere utilizzato come predittivo di risposta per questa terapia.

Fattori pro-angiogenici, come il VEGF-A e il FGF-2 ("fibroblast growth factor 2"), inducono l'espressione di metalloproteinasi (MMPs) che degradano la matrice, con conseguente rimodellamento della matrice extracellulare e invasione dei nuovi vasi sanguigni. Quando le MMPs sono state caratterizzate, si è ipotizzato che il loro contributo allo sviluppo del tumore fosse esclusivamente quello di degradare la matrice extracellulare, facilitando il processo metastatico mediante la migrazione delle cellulare tumorali e la loro invasione del tessuto circostante. Recenti scoperte hanno tuttavia evidenziato un ruolo più complesso per questi marcatori nello sviluppo del tumore. Alle MMPs è adesso riconosciuto un ruolo chiave nella regolazione di vari processi neoplastici in virtù della loro abilità di mediare la differenziazione, proliferazione e sopravivenza delle cellule tumorali, rilasciare fattori di crescita e modulare l'angiogenesi.

L'interrelazione complessa tra i biomarcatori di meccanismo giustifica la loro determinazione simultanea, poiché la misurazione di un'unica molecola non è sufficiente a fornire un quadro realistico delle interazioni biologiche nel microambiente tumorale. Recentemente sono state sviluppate nuove tecnologie con lo scopo di dosare diverse molecole in un'unica reazione, con il vantaggio di ridurre tempo, costo e volume di campione richiesto (~25 µL). Attualmente le piattaforme basate su anticorpi costituiscono la tecnologia "core" per il dosaggio dei biomarcatori in sistema "multiplex". Le due tecniche "multiplex" principali sono basate sulla reazione antigene-anticorpo: i "protein array" e le microsfere in sospensione. I "protein array" sono sistemi altamente miniaturizzati in cui gli anticorpi di cattura sono immobilizzati su un supporto solido. Il rilevamento dell'analita avviene principalmente mediante metodo fluorescente o chemiluminescente. I "multiplex" in sospensione si basano sulla tecnologia Luminex xMAP che sfrutta il principio della citometria a flusso. Questo metodo utilizza microsfere di polestirene o magnetiche ricoperte di anticorpi di cattura e consente di misurare mediante fluorescenza fino a 100 marcatori simultaneamente.

Nel caso dei marcatori "classici" (associati all'estensione del tumore) al momento della identificazione si sapeva solo che erano più intensamente o frequentemente espressi nelle neoplasie che nei tessuti normali. Il fatto che oggi si conoscano alcune loro funzioni è il risultato di studi successivi finalizzati a studiarne possibili ruoli biologici. È importante rimarcare che il razionale che stava alla base della loro scoperta era solo l'associazione con la neoplasia. Diversamente, i marcatori di meccanismo possono essere scelti sulla base della loro funzione biologica. Lo studio dei marcatori di meccanismo ci permette infatti di esplorare circuiti molecolari noti, come l'angiogenesi, la cascata molecolare dell'infiammazione, il bilancio fra attivazione e inibizione delle proteasi, la deregolazione di alcune vie di "signaling". Di ancora maggior rilevanza il fatto che tali circuiti molecolari sono associati a comportamenti clinicamente rilevanti della neoplasia o dell'ospite, come la prognosi o la risposta a diversi regimi terapeutici. Senza dubbio differentemente dai classici marcatori di estensione, lo studio dei marcatori di meccanismo si basa su un forte razionale biologico e clinico *a priori*. Sul piano teorico è quindi verosimile che i marcatori di meccanismo possano assumere un ruolo importante come fattori predittivi o come marcatori di monitoraggio di terapie antitumorali, in particolare di quelle mirate a bersagli biologici.

In un futuro prossimo, i biomarcatori potrebbero rivoluzionare sia lo sviluppo che l'utilizzo dei farmaci. Nuove ricerche hanno dimostrato che la determinazione dei biomarcatori di meccanismo potrebbe predire gli eventuali benefici delle terapie mirate a bersaglio molecolare ("target therapy") durante il trattamento di alcuni tipi di tumore. Questi biomarcatori consentirebbero di selezionare da subito il trattamento più appropriato per i pazienti o quanto meno di stabilire se un determinato paziente potrà o meno trarre beneficio dall'assunzione di un farmaco a bersaglio molecolare e, quindi, di migliorare gli esiti della terapia nel lungo termine. Attualmente, ci sono numerosi studi in fase di sviluppo e quest'area dell'oncologia, in rapida espansione, potrebbe in futuro offrire un contributo significativo al trattamento del cancro. In mancanza di nuovi biomarcatori, gli sviluppi nella "target therapy" saranno limitati e il trattamento con questi farmaci rimarrà altamente empirico. Pertanto, sarebbe fondamentale che lo studio dei biomarcatori fosse incrementato parallelamente allo sviluppo di queste nuove terapie.

Esistono problematiche specifiche che necessitano di essere affrontate per utilizzare i biomarcatori di meccanismo in un prossimo futuro. La relazione di tali marcatori con meccanismi biologici generali (ad es., infiammazione) rappresenta paradossalmente la maggiore difficoltà nel loro possibile trasferimento nella pratica clinica. Prendiamo ad esempio un marcatore tradizionale come il CEA. Nel definire i criteri decisionali si utilizza un livello soglia di riferimento che rappresenta il rumore di fondo biologico. Valori superiori alla soglia sono considerati "segnale". Immaginiamo invece, come marcatore di meccanismo, di considerare l'esempio del

VEGF (associato all'angiogenesi). Il VEGF può essere prodotto e rilasciato dal tumore, ma è anche prodotto e rilasciato dalle piastrine e da vari tipi di leucociti. Il VEGF, da qualsiasi compartimento venga rilasciato, comunque può indurre un'attività di angiogenesi favorevole alla progressione della neoplasia. Per i marcatori di meccanismo ci troviamo quindi nella necessità di saper leggere più segnali diversi, piuttosto che distinguere fra un segnale e il rumore di fondo. In tale scenario gli aspetti preanalitici vanno rivisti sotto nuove prospettive di ricerca in quanto è forse necessario cominciare a considerare i differenti compartimenti del sangue (siero, plasma, piastrine, ecc.) come possibili fonti di informazioni diverse.

Va sottolineato che anche per questi marcatori non sono tuttavia ancora disponibili evidenze sufficienti a proporne un possibile impiego clinico.

Cellule tumorali circolanti

Il processo di metastatizzazione prevede che cellule del tumore primitivo si stacchino ed entrino nel torrente linfatico e circolatorio e tramite questi ultimi vengano trasportate fino a organi periferici, dove, se si verificano condizioni favorevoli, le cellule possono uscire e impiantarsi per dar origine a metastasi: le cellule rilevabili nel sangue vengono chiamate cellule tumorali circolanti (CTC).

Le CTC sono numericamente molto rare in confronto agli altri elementi mononucleati presenti nel sangue (1 CTC ogni 10^{5-7} cellule mononucleate del sangue) e il loro isolamento e identificazione ha posto non pochi problemi tecnici. Ad oggi vengono fondamentalmente utilizzati due approcci: metodi basati sull'analisi degli acidi nucleici per la rilevazione di alcune sequenze o geni differentemente espressi nelle cellule tumorali e nei componenti del sangue e tecniche basate sulla citofluorimetria, che mediante reazioni immunocito-chimiche permette l'identificazione e la caratterizzazione delle singole cellule tumorali. In quasi tutti i casi l'identificazione è preceduta da una fase di arricchimento del campione, in cui mediante tecniche di separazione per gradiente o di filtrazione o infine di separazione immunomagnetica, si cerca di facilitare il recupero delle poche cellule eventualmente presenti nel campione di sangue periferico.

Un ostacolo che ha reso difficile la messa a punto di tecniche affidabili per l'identificazione delle cellule tumorali circolanti è rappresentato dal fatto che queste cellule non presentano "antigeni specifici" utilizzabili nella messa a punto dei sistemi di rilevazione; questo ha comportato e comporta l'utilizzo di marcatori epiteliali o di marcatori espressi più frequentemente dalle cellule tumorali, ma non sempre riscontrabili data l'eterogeneità propria della popolazione neoplastica.

I metodi basati sulla rilevazione tramite PCR (in genere RT-PCR) prevedono la ricerca di alcuni geni tessuto-specifici, come citocheratine, MUC-1, "epidermal growth factor receptor" (EGFR), o di antigeni oncofetali come la β-hCG. Questo approccio offre il vantaggio di un'elevata sensibilità, ma è gravato da difficoltà inerenti la scelta dei geni da valutare, che possono portare a risultati falsamente positivi dovuti proprio alla mancanza di geni tumore-specifici, e dalla mancanza di sistemi standardizzati utilizzabili nella pratica clinica. Inoltre queste metodiche determinano la distruzione delle cellule precludendo la possibilità di effettuarne il conteggio.

Per quanto riguarda i metodi citofluorimetrici, essi sono basati sulla identificazione delle cellule epiteliali circolanti mediante l'impiego di anticorpi monoclonali diretti verso diversi antigeni epitelio-specifici, in genere citocheratine. Recentemente è stata introdotta una nuova tecnologia (CellSearch, Veridex LLC), che si basa sull'arricchimento immunomagnetico del campione di sangue periferico per mezzo di particelle di ferro rivestite dall'anticorpo anti-EpCAM ("epithelial-cell adhesion molecule"). Il campione viene poi incubato in un campo immunomagnetico, sottoposto a diversi lavaggi, quindi le cellule vengono colorate con un colorante per gli acidi nucleici (DAPI) e con un anticorpo anticitocheratine 8, 18 e 19, entrambi coniugati con coloranti fluorescenti. Per evitare la contaminazione con leucociti viene aggiunto anche un anticorpo anti-CD45, per escludere dalla conta i globuli bianchi. Il campione finale viene dispensato all'interno di un capillare e letto tramite un microscopio a fluorescenza dedicato e automatizzato: le CTC sono le cellule che risultano DAPI positive, citocheratine positive e CD45 negative.

Come per altri marcatori tumorali, le CTC potrebbero essere di ausilio nelle diverse fasi della malattia, permettendo la valutazione della prognosi sia nella malattia in fase iniziale, che nella fase avanzata. Le CTC potrebbero inoltre essere utili per predire la risposta a determinate terapie o infine nel "follow up" di pazienti liberi da malattia, permettendo la rilevazione precoce della recidiva. Tuttavia, i dati a nostra disposizione non sono ancora sufficientemente solidi in tutti gli stadi della malattia tumorale.

I primi dati che hanno messo in luce il valore prognostico del riscontro di CTC sono stati pubblicati all'inizio degli anni 2000 e hanno valutato pazienti con tumore metastatico della mammella: tali studi hanno evidenziato come il riscontro con sistema CellSearch di un numero di CTC ≥5/7,5 mL di sangue identifichi un gruppo di pazienti con ridotta sopravvivenza. Le CTC sono inoltre risultate un marcatore affidabile anche in confronto alla radiologia nella valutazione della risposta alla terapia. Questi riscontri sono stati poi confermati anche nel caso di pazienti affetti da tumore della prostata e del colon retto metastatici, tanto che il sistema CellSearch per la determinazione delle CTC è stato approvato dalla FDA per il "follow-up" di pazienti con tumori metastatici della prostata, mammella e colon retto.

Il vero utilizzo delle CTC dovrebbe però risiedere nella possibilità di utilizzare il dato per migliorare o rendere più mirate le terapie. Diversi sono gli approcci intrapresi. Ad esempio, è stato avviato negli Stati Uniti uno studio (SWOG 0500) che prevede l'arruolamento delle pazienti con tumore della mammella metastatico

nelle quali il prelievo per la valutazione delle CTC viene effettuato prima dell'inizio di chemioterapia. Nelle pazienti con un numero di CTC ≥5, viene effettuata una seconda valutazione dopo 3 settimane dall'inizio del trattamento. Le pazienti con un numero di CTC >5 vengono randomizzate a continuare la stessa terapia oppure a un passaggio a terapia diversa. L'obiettivo di questo studio (che ha come obiettivi primari la sopravvivenza globale e la sopravvivenza libera da progressione) è quello di verificare se le CTC possano precocemente indicare che la paziente non sta rispondendo alla terapia, permettendo quindi una pianificazione di un nuovo trattamento potenzialmente efficace.

Un altro importante approccio è rappresentato dalla possibilità di caratterizzare biologicamente le CTC. Ad oggi infatti le decisioni terapeutiche vengono prese, oltre che su valutazioni cliniche, anche sulla base delle caratteristiche biologiche determinate sul tumore primitivo al tempo dell'intervento chirurgico, quindi spesso anni prima. Tuttavia vi sono oramai parecchi dati in letteratura che dimostrano che la biologia della malattia metastatica può essere diversa dalla biologia della malattia primaria, in termini di espressione dei recettori ormonali o di iperespressione di HER2 (recettore umano per il fattore di crescita epidermico, anche detto HER-2, HER2/neu o ErbB2/neu). Dati questi presupposti, diventa importante poter effettuare non soltanto la determinazione quantitativa delle CTC, ma anche la loro caratterizzazione in termini di espressione di HER-2 o di recettori per estrogeni e progesterone, in modo da poter candidare le pazienti a una terapia, potenzialmente efficace, alla quale altrimenti non avrebbero accesso. Alcuni studi preliminari sono iniziati e i risultati saranno disponibili a breve.

Le CTC potrebbero essere caratterizzate per quel che riguarda il loro potenziale di staminalità. Numerosi marcatori sono stati proposti per identificare la cellula tumorale staminale e questi potrebbero essere testati sulle CTC, in quanto il loro riscontro potrebbe giustificare la resistenza alle chemioterapie tradizionali e orientare verso forme di trattamento a bersaglio più specifico. Un'ulteriore applicazione potrebbe utilizzare le CTC per testare *in vitro* l'efficacia di farmaci, prima della loro somministrazione nei pazienti.

Se nella malattia avanzata, soprattutto nel caso del tumore della mammella, i risultati disponibili sono abbastanza consolidati, qualche difficoltà esiste invece nella valutazione del ruolo delle CTC nella malattia localizzata. Gli studi ad oggi disponibili in pazienti trattate con terapia adiuvante hanno utilizzato sistemi di rilevazione delle CTC basati soprattutto su RT-PCR per mRNA della citocheratina 19: il riscontro di CTC prima dell'inizio della chemioterapia adiuvante (chemioterapia e/o ormonoterapia) o al termine della terapia si è dimostrato essere un fattore prognostico indipendente (in termini di sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza globale) sia in pazienti senza interessamento linfonodale che in pazienti con interessamento linfonodale.

In conclusione, si può dire che la determinazione quantitativa delle CTC rappresenta solo la punta dell'iceberg, in quanto è sicuramente molto più vasto il contributo che la loro caratterizzazione può fornire per quanto riguarda la comprensione di fenomeni biologici e clinici della malattia. Tuttavia, non ci sono ancora studi che abbiano riportato come queste conoscenze possano poi trovare un'applicazione clinica, ma sicuramente il loro potenziale è molto elevato.