

# Biopsia liquida e NGS: la nuova frontiera della ricerca clinica traslazionale

Il DNA libero circolante ha il potenziale di mettere ordine nell'eterogeneità del tumore.

## Introduzione

Il DNA libero circolante (cfDNA) presente può derivare da vari tessuti, tumori o altri microrganismi presenti nel corpo. L'analisi bioptica liquida del cfDNA nel sangue è particolarmente utile per valutare e monitorare alcune malattie, tra cui il tumore.

I tumori possono rilasciare una quantità significativa di DNA. Il DNA rilasciato da una cellula tumorale morta, denominato DNA tumorale circolante (ctDNA), rappresenta una piccola frazione del cfDNA totale nel sangue. Pertanto, per rilevare le mutazioni somatiche a basse frequenze, è necessario un saggio ben formulato.

I metodi di sequenziamento di nuova generazione (NGS) consentono di rilevare in modo altamente sensibile e specifico le mutazioni note. Recentemente, sono in fase di sviluppo saggi completi per analizzare una gamma più ampia di geni candidati e di tipi di varianti per nuovi tumori per i quali non vi sono varianti note. Con l'evoluzione di questi metodi, l'analisi del ctDNA per diverse applicazioni come lo screening, la selezione della terapia, il monitoraggio e l'identificazione della resistenza alla terapia sta acquisendo un'importanza sempre maggiore come metodo per il monitoraggio dello stato di malattia.

## Vantaggi della biopsia liquida rispetto alla biopsia tissutale

Poiché è un metodo di acquisizione del campione relativamente non invasivo, la biopsia liquida è particolarmente importante nei casi in cui il tessuto di interesse non è accessibile. Anche quando è possibile accedere ai tessuti malati, la rebiopsia ai fini del monitoraggio di molte patologie è un'opzione desiderata, e in questo caso l'analisi del cfDNA offre diversi vantaggi.

L'acquisizione di campioni per la biopsia liquida può essere effettuata con i comuni metodi di flebotomia, per i quali abbondano professionisti adeguatamente formati. La biopsia dei tessuti, invece, richiede spesso competenze specialistiche da parte di tecnici o chirurghi qualificati. Per questa fase essenziale, la biopsia liquida è più economica, offre un tempo di elaborazione più breve e riduce la probabilità di eventi avversi associati. Dopo l'acquisizione del campione, i metodi di estrazione del DNA ottimizzati per l'analisi del cfDNA sono più rapidi e meno costosi rispetto a quelli che si applicano ai campioni fissati in formalina inclusi in paraffina (FFPE). L'accesso a tessuti specifici può limitare

notevolmente la biopsia dei tessuti per le valutazioni iniziali o le biopsie ripetute. Le linee guida del National Comprehensive Cancer Network (NCCN) riviste raccomandano ora la biopsia liquida per alcuni tipi di tumore, soprattutto nei casi in cui la biopsia tissutale non è possibile, come nel caso del tumore polmonare non a piccole cellule.<sup>1</sup>

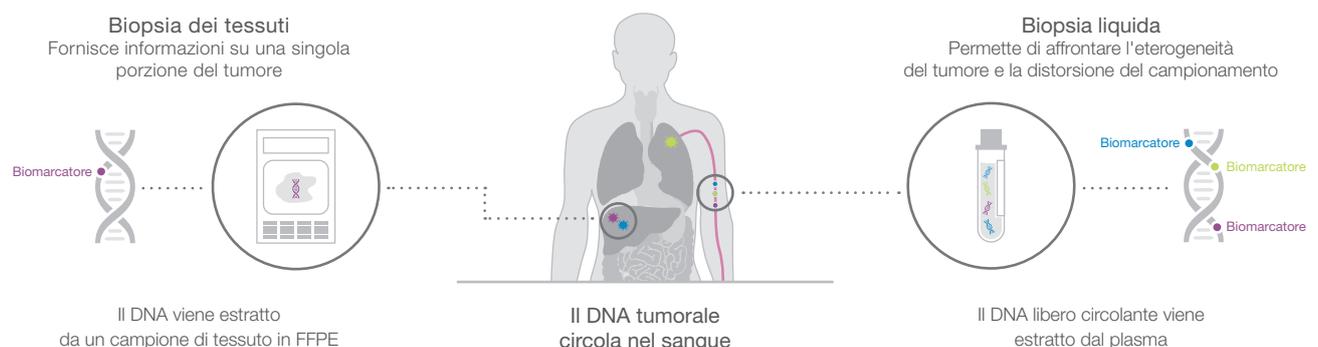
Sebbene il ctDNA proveniente da una specifica sorgente tissutale rappresenti solo una piccola frazione del cfDNA totale, l'analisi del cfDNA è stata perfezionata al punto da renderla uno strumento valido per la valutazione dell'eterogeneità del tumore e per superare le distorsioni del campionamento tissutale. L'analisi del ctDNA può essere utilizzata per monitorare la progressione della patologia e la risposta al trattamento. Con metodi di sequenziamento in grado di identificare nuove mutazioni, la biopsia liquida può essere particolarmente utile per il monitoraggio della resistenza acquisita derivante da nuove alterazioni. Con l'aumento della sensibilità e lo sviluppo di saggi in grado di valutare numerosi geni contemporaneamente, è possibile utilizzare il cfDNA per un profilo tumorale completo (Figura 1). Pertanto, la biopsia liquida è in grado di identificare nuove mutazioni durante la progressione della malattia e mutazioni che sorgono in nuovi tessuti al di fuori della sorgente originaria del tumore.

## Tecnologie utilizzate per l'analisi del ctDNA

I metodi molecolari più comunemente usati per analizzare il cfDNA sono PCR quantitativa (qPCR), la PCR digitale a goccia (ddPCR) e la NGS. I due metodi PCR prevedono l'uso di sonde per DNA specifiche per individuare specifici geni e produrre una misurazione quantitativa del numero di target del campione. Anche la NGS prevede l'uso di sonde per l'acquisizione di specifici frammenti di DNA, ma l'output dei dati è la sequenza del DNA catturato.

**qPCR:** la qPCR è efficiente quando si analizza un piccolo numero di varianti. Tuttavia, i saggi qPCR sono limitati a un numero relativamente ridotto di target specificati e valutano solo i tipi di variante specificati; dal punto di vista della scoperta pertanto, il loro valore è limitato.

**ddPCR:** il metodo ddPCR è superiore al qPCR per quanto riguarda la precisione, anche se il costo e le competenze tecniche necessarie sono maggiori. Anche il metodo ddPCR ha poco valore in termini di scoperta, in quanto il numero di target e i tipi di variante sono limitati dal design del saggio specifico.



**Figura 1: I nuovi metodi molecolari possono valutare numerosi tessuti e biomarcatori a partire da campioni di plasma.** La profilazione genomica completa che utilizza il cfDNA consolida centinaia di marcatori in un unico saggio.

**Tabella 1: Confronto tra PCR e NGS mirato**

Metodo	Vantaggi	Problemi
PCR	Elevata sensibilità Flusso di lavoro familiare Dispositivi e attrezzature già presenti nella maggior parte dei laboratori	Può interrogare solo una serie limitata di varianti a bassa risoluzione Quasi nessun potere di scoperta Bassa scalabilità dovuta all'aumento dei requisiti di input del campione
NGS mirato	La maggiore profondità di sequenziamento consente una maggiore sensibilità (fino allo 0,5%) Maggiore potere di scoperta, ideale per affrontare l'eterogeneità del tumore Maggiore risoluzione della variante Processività del campione più elevata con multiplex dei campioni	Meno conveniente il sequenziamento di un numero ridotto di target (< 20) Non molto efficiente in termini di tempo per il sequenziamento di un numero ridotto di target (< 20)

**NGS:** poiché il metodo NGS comporta la risoluzione di sequenze di DNA a singolo nucleotide, questo metodo è dotato della capacità di scoprire nuove varianti senza conoscenze preliminari incluse nel design del saggio. Ciò consente di valutare più tipi di varianti e di scoprire mutazioni in una nuova posizione di un gene. Per l'analisi di un piccolo numero di varianti o campioni, il metodo NGS è più costoso e richiede più tempo. Ma, nei saggi progettati per coprire più target molecolari, la completezza del metodo NGS risulta più efficiente e meno costosa (Tabella 1).

## Vantaggi del metodo NGS per la biopsia liquida

Il metodo NGS sequenzia milioni di frammenti di DNA in parallelo, e in seguito effettua un allineamento computazionale delle letture rispetto al genoma. A seconda del design del saggio, il metodo NGS può essere molto completo e coprire un gran numero di target genici e tipi di varianti. Con il continuo aumento del numero di biomarcatori utilizzabili nei trattamenti antitumorali, la capacità di consolidare un gran numero di biomarcatori in un unico test diventerà probabilmente sempre più importante, sia nella ricerca, sia in ambito clinico e permetterà di ridurre il numero di test necessari per trovare risposte significative. Il metodo NGS ha il potenziale per consentire un risparmio di campioni, tempo e denaro evitando i test iterativi.

Le opzioni per la preparazione delle librerie di sequenziamento, come la chimica di acquisizione ibrida, consentono di estrarre dai campioni di cfDNA grandi frammenti di geni target. È possibile progettare sonde di ibridazione sufficientemente grandi da catturare i target anche quando esistono mutazioni nelle regioni ibridate. Il successivo sequenziamento dei target acquisiti permette di scoprire nuove mutazioni per le quali non è richiesta una conoscenza preventiva durante la progettazione del saggio. I saggi NGS possono essere progettati sia per acquisire un gran numero di geni con bassa profondità di sequenziamento (più completi, meno sensibili), sia un numero relativamente piccolo di geni con una maggiore profondità di sequenziamento (meno completi, più sensibili). Nel caso di biopsia liquida, in cui la frazione di cfDNA all'interno di un campione di cfDNA è potenzialmente bassa, per avere la sensibilità necessaria a rilevare accuratamente le varianti poco frequenti, è necessaria una profondità di sequenziamento elevata. Pertanto, sebbene esistano pannelli di geni NGS con un contenuto completo, fino a poco tempo fa, la loro applicazione alla biopsia liquida era limitata, a causa di problemi di sensibilità.

## Il metodo NGS consente una profilazione genomica completa

Le recenti migliorie apportate alla strumentazione di sequenziamento forniscono opzioni per il sequenziamento dei campioni a profondità di copertura elevatissime per grandi porzioni del genoma in un singolo campione. Grazie alla sua capacità di fornire un valore completo unito a un'elevata sensibilità e specificità, il metodo NGS permette di analizzare centinaia di geni con la profondità di sequenziamento necessaria per l'analisi del cfDNA. Queste caratteristiche permettono

di valutare un gran numero di mutazioni conosciute e di scoprire nuove mutazioni guida nella ricerca sul cancro. Per una maggiore precisione, sono disponibili nuovi strumenti molecolari e metodi bioinformatici. Gli identificatori molecolari univoci (UMI) possono essere integrati nelle preparazioni delle librerie del DNA in modo da marcare le singole molecole di DNA prima delle fasi di amplificazione; gli identificatori possono successivamente essere utilizzati durante l'analisi dei dati per identificare gli errori introdotti dalla PCR. Sofisticati algoritmi identificano gli artefatti di sequenziamento e riducono i rumori di fondo che inducono all'errore, facilitando l'identificazione di vere varianti ad alta specificità.

La biopsia liquida unita a saggi molecolari completi al fine di valutare le varianti somatiche permette di individuare nuove mutazioni derivanti dall'evoluzione del tumore, dalla resistenza ai farmaci e dalle metastasi. Il cancro è una patologia imprevedibile in cui i geni guida non sempre sono noti e non vengono sempre correttamente stimati per ogni tipo di tessuto. Grazie alla capacità di valutare contemporaneamente numerosi geni e numerosi tessuti, la sinergia della biopsia liquida con la profilazione genomica completa resa possibile dal metodo NGS offre un alto valore. Recenti studi che hanno eseguito biopsie liquide abbinate alle biopsie dei tessuti corrispondenti provenienti da campioni tumorali hanno dimostrato che, quando si utilizzano saggi completi, l'analisi cfDNA ha rilevato un numero significativo di biomarcatori raccomandati dalle linee guida e di alterazioni della resistenza non rilevati tramite la biopsia dei tessuti corrispondenti.<sup>2,3</sup>

## Riepilogo

Nell'era della medicina di precisione, un numero crescente di biomarcatori sta portando a un corrispondente aumento dell'interesse per i metodi molecolari in grado di consolidare numerosi biomarcatori in un singolo test. Su un altro fronte, gli studi hanno dimostrato che la biopsia liquida, grazie a una panoramica più ampia dell'evoluzione dei tumori sistemici, può fornire informazioni preziose per alcuni tipi di tumore che potrebbero essere non rilevati dalla biopsia tissutale localizzata. Con i recenti progressi della tecnologia NGS, entrambi questi obiettivi possono essere raggiunti, consentendo una profilazione genomica completa unita alla sensibilità e alla specificità richieste per le applicazioni di biopsia liquida.

## Bibliografia

1. NCCN Guidelines. [www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/default.aspx](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx). Consultato il 13 dicembre 2018.
2. Parikh AR, Leshchiner I, Elagina L, et al. Liquid versus tissue biopsy for detecting acquired resistance and tumor heterogeneity in gastrointestinal cancers. *Nat Med.* 2019;25(9):1415-1421.
3. Leigh NB, Page RD, Raymond VM, et al. Clinical Utility of Comprehensive Cell-free DNA Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2019;25(15):4691-4700.