

Screening per il tumore polmonare in soggetti ad alto rischio: diagnosi precoce con TC spirale associata a stratificazione del rischio con miRNA circolanti

Lung cancer screening in high-risk subjects: early detection with LDCT and risk stratification using miRNA-based blood test

Stefano Sestini,¹ Mattia Boeri,² Alfonso Marchianò,³ Mario Silva,⁴ Giuseppina Calareso,⁵ Carlotta Galeone,⁵ Gabriella Sozzi,² Ugo Pastorino¹

¹ Struttura complessa di chirurgia toracica, Fondazione IRCCS Istituto nazionale dei tumori, Milano

² Struttura complessa di genomica tumorale, Dipartimento di oncologia sperimentale, Fondazione IRCCS Istituto nazionale dei tumori, Milano

³ Dipartimento di diagnostica per immagini e radioterapia, Fondazione IRCCS Istituto nazionale dei tumori, Milano

⁴ Dipartimento di scienze cliniche, Unità operativa di radiologia, Università di Parma

⁵ Dipartimento di statistica e metodi quantitativi, divisione di biostatistica, epidemiologia e salute pubblica, Unità di ricerca sanitaria e farmacoepidemiologia, Università degli Studi di Milano-Bicocca

Corrispondenza: Ugo Pastorino, ugo.pastorino@istitutotumori.mi.it

RIASSUNTO

Il tumore del polmone rimane a tutt'oggi una patologia con un elevato tasso di mortalità a fronte degli sviluppi delle metodiche diagnostiche e terapeutiche avvenute negli ultimi vent'anni. L'analisi delle esperienze provenienti dai primi studi di screening – in cui veniva utilizzata la radiografia del torace (RX torace) associata o meno all'esame citologico su espettorato – non ha permesso di rilevare la riduzione della mortalità specifica per tumore polmonare. I successivi studi di screening che hanno introdotto l'utilizzo della TC del torace a bassa dose (LDCT) hanno permesso di rilevare un elevato numero di tumori polmonari in stadio iniziale, quindi potenzialmente curabili; ciò, tuttavia, non ha permesso di dimostrare una diminuzione della mortalità per tumore polmonare. Con i risultati dello studio statunitense National Lung Screening Trial (NLST) pubblicati nel 2011 è stata evidenziata per la prima volta una riduzione di mortalità specifica per tumore del polmone del 20% grazie all'utilizzo della LDCT in confronto alla RX torace. È stata anche descritta una percentuale di falsi positivi del 96,4%, con una sovradiagnosi che può arrivare fino al 78,9% per i tumori polmonari bronchioloalveolari. In considerazione dell'elevata sensibilità della LDCT, capace di identificare un nodulo polmonare non calcifico in un soggetto su due, emerge la necessità di avvalersi di strumenti per poter identificare con maggiore accuratezza i noduli sospetti. Fino a qualche tempo fa, l'eventuale utilizzo dei marcatori tumorali polmonari non era percorribile, in considerazione della scarsa specificità dell'organo. Lo studio e lo sviluppo si è, quindi, spinto verso marcatori specifici per organo e tessuti, come i microRNA (miRNA), sequenze di RNA non codificante, ma coinvolto in molti processi oncogenici ed espressione di un'attività del microambiente.

L'utilizzo di biomarcatori come i miRNA circolanti implementati in uno screening LDCT ha messo in luce una riduzione di 5 volte la percentuale di falsi positivi, che passa da 19,4% a 3,7%, con una sensibilità dell'87%, una specificità dell'81% e un valore predittivo negativo del 99%. La necessità di utilizzare le risorse a disposizione in maniera adeguata e commisurata alla malattia che si vuole curare spingerà sempre più l'implementazione di screening LDCT con biomarcatori, stabili e facilmente riproducibili, come i miRNA circolanti, ottimizzando i rapporti costi-beneficio e ovviando a problematiche quali i falsi positivi, procedure invasive inutili, chirurgia per lesioni benigne. Lo sviluppo di biomarcatori specifici sembra offrire nuovi promettenti prospettive.

Parole chiave: tumore del polmone, screening LDCT, diagnosi precoce, biomarcatori, miRNA

ABSTRACT

Lung cancer still remains a high mortality disease in the face of developments in diagnostic and therapeutic methods that occurred in the last 20 years. The analysis of the experiences from the first studies – in which chest X-ray (CXR) was adopted, associated or not with sputum cytology – has failed to show a reduction in lung cancer specific mortality. Subsequent screening studies that have introduced the use of low-dose computed tomography (LDCT) have revealed a large number of early-stage lung cancers, thus potentially curable; however, this has not allowed us to demonstrate a decrease in lung cancer-specific mortality. With the results of the American study National Lung Screening Trial (NLST), published in 2011, for the first time a lung cancer-specific mortality reduction by 20% thanks to the use of LDCT compared to RXT, was highlighted. However, a false positive rate of 96.4% was also described with an overdiagnosis that can be up to 78.9% for bronchioalveolar lung cancer. Due to the high sensitivity of LDCT, able to identify a non-calcified pulmonary nodule in one subject on two, it becomes necessary to avail instruments to more accurately identify suspicious nodules. Until some time ago, the possible use of lung tumour markers was not viable in view of the poor organ specificity. The study and development was, then, pushed to organ- and tissue-specific markers such as microRNA (miRNA), non-coding RNA sequences involved in many processes and expression of oncogenic activity of the microenvironment.

The use of biomarkers such as circulating miRNA implemented in LDCT screening has highlighted a reduction of 5 times for the rate of false positives, going from 19.4% to 3.7%, with a sensitivity of 87%, a specificity of 81%, and a negative predictive value of 99%. The need to appropriately use the available resources commensurate with the disease to treat will push more and more towards the implementation of LDCT biomarkers based screenings, stable and easily reproducible, as circulating miRNAs, obviating to problems such as false positives, unnecessary procedures of invasive surgery for benign lesions, and optimizing the cost-benefit ratios. The development of new specific biomarkers appears to offer new promising prospects.

Keywords: lung cancer, LDCT screening, early diagnosis, biomarkers, miRNA

INTRODUZIONE

Il tumore del polmone è la causa più comune di morte per cancro in tutto il mondo, responsabile di quasi una morte su cinque per cancro (19,4% del totale, 1,59 milioni di morti). A causa dell'elevata aggressività della malattia, la mortalità risulta simile all'incidenza (1,8 milioni di casi).^{1,2} Nonostante la notevole riduzione della prevalenza dei fumatori attivi e la mortalità per cancro al polmone negli uomini, conseguenti all'introduzione di una regolamentazione del fumo nei Paesi sviluppati, milioni di ex-fumatori rimangono ad alto rischio di ammalarsi di tumore del polmone per molti anni.

I miglioramenti nella gestione clinica del cancro del polmone sono stati modesti nel corso degli ultimi 20 anni, con un tasso complessivo di sopravvivenza a 5 anni poco superiore al 10% in Europa e del 16% negli Stati Uniti. Il fallimento del trattamento è dovuto principalmente alla presenza della malattia metastatica al momento della diagnosi, che si verifica nel 70% di tutti i pazienti, mentre in quelli sottoposti a resezione in stadio IA il tasso di sopravvivenza a 5 anni è superiore al 70%.^{3,4}

La diagnosi del tumore del polmone in fase precoce offre la reale possibilità di ridurre la mortalità con le nuove possibilità di cura. I risultati dello studio americano National Lung Screening Trial (NLST) hanno messo in evidenza le prospettive favorevoli per l'identificazione del cancro del polmone attraverso l'utilizzo della TC torace a basso dosaggio (LDCT) nello screening, nonostante il profilo costi-benefici dello screening per il tumore polmonare, ad oggi, sia ancora oggetto di dibattito nella comunità scientifica.⁵ In particolare, gli elevati tassi di falsi positivi della LDCT portano alla ripetizione delle indagini con TC, comportando una reiterata esposizione a radiazioni, con il rischio di sottoporre il soggetto a procedure invasive di follow-up diagnostici con morbilità associata, così come un aumento di tempi e costi. Inoltre, lo screening con utilizzo della LDCT ha mostrato un effetto limitato sui tumori polmonari più aggressivi, ottenendo una riduzione complessiva della mortalità di solo il 20%. Siamo di fronte a un'ondata imminente di noduli polmonari provenienti da una combinazione di risultati incidentali e a una proliferazione di programmi di screening LDCT rivolti a soggetti ad alto rischio. La gestione di una tale quantità di noduli polmonari indeterminati (IPN) risulta impegnativa, data l'elevata frequenza di rilevamento (da circa il 20% al 60% dei soggetti ad alto rischio), e molto spesso più dannosa che utile, considerando che la grande maggioranza di questi noduli polmonari risultano benigni (fino al 96%). L'utilizzo di biomarcatori selettivi inserito in un percorso di screening eseguito presso centri dedicati, con una specifica esperienza, potrebbe essere una strategia vincente per migliorare l'iter diagnostico, diminuendo così gli accertamenti diagnostici invasivi e i rischi che ne conseguono. In particolare, i biomarcatori ematici potrebbero influenzare significativamente le presta-

zioni dello screening LDCT permettendo di ottenere una riduzione del numero di soggetti necessari da seguire e, di conseguenza, una diminuzione dei falsi positivi e della sovradiagnosi che le indagini LDCT molto spesso generano.

INDAGINI STRUMENTALI NELLO SCREENING DEL TUMORE DEL POLMONE

Con l'avvento dell'era industriale, la diffusione dell'abitudine al fumo condizionò un aumento significativo del tumore polmonare. Dovette passare un lungo periodo di tempo per poter osservare e convalidare la connessione tra fumo e cancro ai polmoni. Una volta riconosciuto, vennero avviati diversi programmi per la diagnosi precoce. Il National Cancer Institute sponsorizzò diversi studi clinici randomizzati per testare la radiografia del torace (RX torace) all'interno di screening per il cancro del polmone: lo studio della Johns Hopkins,⁶ lo studio del Memorial Sloan-Kettering,⁷ il Mayo Lung Project⁸ e, più tardi, anche lo studio Prostate, Lung, Colorectal e Ovarian Cancer Screening (PLCO), che arruolò 154.901 soggetti.⁹ In tutti questi studi, basati sulla RX torace, non venne trovata alcuna differenza significativa nella mortalità specifica per tumore polmonare. Inoltre, venne messa in luce una maggiore evidenza di tumori in fase iniziale.¹⁰ Dato che questi risultati furono considerati deludenti e grazie all'avvento delle nuove tecnologie di imaging, vennero lanciate in tutto il mondo nuove sperimentazioni cliniche che si avvalsero dell'utilizzo della tomografia computerizzata (TC) e, in particolare, della TC spirale a bassa dose di radiazioni (LDCT) (tabella 1). La LDCT è una tecnologia molto sensibile che analizza il corpo in un percorso a spirale, permettendo di ottenere un numero maggiore di immagini in un tempo più breve. Grazie a questa metodica, si ha, inoltre, la possibilità di creare immagini 3D molto dettagliate, in grado di rilevare anche le più piccole anomalie.

Studi di screening con TC torace spirale a bassa dose (LDCT)

I primi studi di screening iniziarono negli anni Novanta in Giappone, dove due gruppi di lavoro mostrarono in che modo la LDCT poteva essere in grado di diagnosticare meglio il cancro al polmone rispetto alla RX torace all'interno di una popolazione di 1.369 e 3.967 individui ad alto rischio, rispettivamente.^{11,12}

■ Nel 1992, negli Stati Uniti, Henschke et al. promossero l'Early Lung Cancer Action Project (ELCAP), pensato per valutare contemporaneamente in 1.000 individui ad alto rischio sia la LDCT sia la RX torace, nell'indagine basale e anche nelle ripetizioni annuali dello screening.¹³ All'indagine basale, la LDCT identificò noduli non calcifici sospetti in 233 casi, mentre la RX torace in 68 casi; vennero identificati, rispettivamente, 27 tumori polmonari con la LDCT contro i 7 della RX torace. L'ELCAP si trasformò successivamente in International-ELCAP (I-ELCAP).¹⁴ Tra il 1993

e il 2005, furono arruolati 31.567 partecipanti. I tumori polmonari in stadio I rappresentarono l'85% e il tasso stimato di sopravvivenza a 10 anni, indipendentemente dal trattamento, fu dell'88%. Gli autori conclusero che l'80% dei decessi per cancro ai polmoni erano prevenibili attraverso lo screening e che l'utilizzo della LDCT nello screening sarebbe potuto essere molto conveniente.

■ Tra l'agosto 2002 e il 2004, 53.454 soggetti ad alto rischio vennero arruolati in 33 diversi centri medici statunitensi appartenenti all'NLST.⁵ L'NLST è stato il più grande studio progettato e dimensionato per rispondere al quesito se in un trial clinico randomizzato uno screening con la LDCT confrontato con uno screening con la RX torace possa ridurre la mortalità specifica per tumore del polmone. I soggetti vennero randomizzati e sottoposti alla LDCT oppure alla RX torace ogni anno per tre anni. Vennero identificati 645 casi di tumori polmonari per 100.000 anni-persona nel braccio LDCT e 572 nel braccio RX torace. I decessi per tumore polmonare furono 247 per 100.000 anni-persona nella LDCT rispetto ai 309 con RX torace, con una conseguente riduzione del 20% di mortalità grazie alla LDCT; venne anche osservata una diminuzione del 6,7% in tutte le cause di mortalità nel braccio LDCT.

In Europa, altri studi randomizzati minori procedevano in parallelo:

- il trial clinico olandese-belga (NELSON), il più grande, con oltre 15.000 soggetti;¹⁵
- lo studio danese Danish Lung Cancer Screening Trial

(DLCST), lanciato nel 2004 e che arruolò 4.104 soggetti;¹⁶

■ il progetto Multicentric Italian Lung Detection (MILD), che ha arruolato 4.099 partecipanti;¹⁷

■ il progetto tedesco Lung Tumour Screening and Intervention Trial (LUSI), con 4.052 partecipanti randomizzati in LDCT rispetto a osservazione;¹⁸

■ i progetti italiani ITALUNG, con 3.206 partecipanti, e Detection and Screening of Early Lung Cancer by Novel Imaging Technology and Molecular Essays (DANTE), con 2.472 soggetti;^{19,20}

■ il progetto Depiscan francese, in cui 621 partecipanti sono stati randomizzati tra LDCT e RX torace.²¹

In tutti questi studi, anche se la LDCT era in grado di rilevare i tumori nelle fasi più iniziali, non è stata osservata alcuna riduzione della mortalità specifica per tumore del polmone mediante l'utilizzo della LDCT. Diversi altri studi osservazionali a braccio singolo sono stati eseguiti in tutto il mondo, ma non è stato osservato alcun beneficio significativo della mortalità per tumore del polmone.²²⁻²⁵

Ciò che è chiaramente emerso attraverso tutti questi studi di screening con LDCT è stato l'aumento significativo di tumori polmonari in fase iniziale (e quindi reseccabili) sia rispetto a studi con RX torace sia all'esperienza clinica. Un'altra osservazione che emerge è l'elevata percentuale di identificazione di noduli non calcifici che arrivano fino al 50% nelle indagini TC. Una tale quantità di risultati falsi positivi ha spinto a prendere in considerazione in indagini successive i temi della morbidità e del rapporto costi-benefici dello screening con LDCT.

	RANDOMIZZAZIONE E PARTECIPANTI	TUMORI DEL POLMONE AL BASELINE	STADIO I	MORTI PER TUMORE DEL POLMONE
	n.	n.	%	n.
LSS (USA, 2000)	CT: 1.660 CXR: 1.658	30 7	48 40	– –
NLST (USA, 2002)	CT: 26.722 CXR: 26.732	270 136	63 48	356 443
NELSON (Paesi Bassi-Belgio, 2003)	CT: 7.557 Controllo: 8.265	70 –	64 –	– –
DLCST (Danimarca, 2004)	CT: 2.052 Controllo: 2.052	17 –	53 –	– –
MILD (Italia, 2005)	CT annuale: 1.190 CT biennale: 1.186 Controllo: 1.723	11 6 –	62 70 –	12 6 7
LUSI (Germania, 2007)	CT: 2.029 Controllo: 2.023	22 –	82 –	– –
ITALUNG (Italia, 2004)	CT: 1.613 Controllo: 1.593	20 –	48 –	– –
DANTE (Italia, 2001)	CT: 1.276 Controllo: 1.196	47 –	66 –	20 20
Depiscan (Francia, 2002)	CT: 330 CXR: 291	8 1	37 100	– –

CT: tomografia computerizzata / computed tomography
CXR: RX torace / Chest x-ray

Tabella 1. Tomografia computerizzata a bassa dose (LDCT) in trial clinici randomizzati.

Table 1. Low-dose computed tomography (LDCT) in randomized clinical trials.

I principali problemi clinici in studi di screening LDCT

Nel tentativo di chiarire la reale efficacia dello screening del cancro del polmone, nel lavoro di Bach et al. è stato applicato un modello di previsione di cancro del polmone a 3 studi prospettici di screening a braccio singolo LDCT: il principale risultato consisteva nel confronto tra i nuovi casi di tumore del polmone osservati e quelli predetti, così come il confronto tra le resezioni polmonari, i casi avanzati e le morti per tumore del polmone sempre tra i casi osservati e quelli predetti.²⁶ Per l'analisi, sono stati raggruppati 3.246 partecipanti: sono stati diagnosticati 144 tumori al polmone rispetto ai 44,5 predetti; gli interventi per il tumore al polmone sono stati quasi 10 volte più del previsto. Il cancro del polmone avanzato non è diminuito (42 soggetti osservati confrontati con 33,4 attesi), così come la mortalità per cancro al polmone (38 osservata *vs.* 38,8 attesa). Gli autori hanno concluso che, indipendentemente dall'aumento del tasso di diagnosi e di trattamento di cancro al polmone nel corso di screening, non è stata osservata né una riduzione dei casi di tumore polmonare in stadio avanzato né una riduzione di mortalità specifica per tumore del polmone. Inoltre, essi hanno sottolineato che, sebbene un'eccellente sopravvivenza dei pazienti con tumore del polmone in stadio precoce sia mandatoria per uno screening LDCT, per essere considerato utile, l'utilizzo della LDCT dovrebbe essere in grado di intercettare le forme più aggressive tumorali, che sono quelle con un impatto maggiore sulla mortalità.

Recentemente, è stata fornita un'ampia panoramica di tutti gli screening randomizzati europei del tumore del polmone che utilizzano la LDCT (EUCT), che includono più di 37.000 persone e la cui analisi dei dati è prevista per i prossimi anni.²⁷

I risultati mostrati dall'NLST hanno sollevato un dibattito nella comunità scientifica su come contestualizzare l'esperienza in uno screening nazionale per cancro del polmone e sui potenziali rischi e benefici.²⁸ Per quanto riguarda la sovradiagnosi nell'ambito del trial NLST, un recente studio condotto da Patz e collaboratori ha dimostrato che il 18% dei pazienti con cancro del polmone rilevato con LDCT, il 22% dei pazienti con tumore del polmone non a piccole cellule (*non small cell lung cancer*, NSCLC) e fino al 78,9% dei pazienti con diagnosi di carcinoma bronchioalveolare erano frutto di una sovradiagnosi, che ha portato a ulteriori esami con una notevole percentuale di comorbidità (1,4% nel braccio LDCT e 1,6% nel braccio di RX torace), quali emotorace, collasso polmonare e conseguenze psicosociali.²⁹

In ultima analisi, il rapporto costo-efficacia dello screening LDCT è ancora oggi oggetto di dibattito, con valori che vanno da 4.000 dollari per anno di vita guadagnato a più di 250.000 dollari per la qualità di anni-vita aggiustati guadagnati.³⁰ Finora non ci sono abbastanza conoscenze per

dimostrare che lo screening LDCT abbia un rapporto costo-efficacia favorevole. Mentre l'NLST ha dimostrato una riduzione significativa della mortalità per tumore del polmone utilizzando la LDCT, diverse valutazioni dovrebbero essere considerate nell'elaborazione di linee guida per lo screening di massa, con particolare attenzione alla cessazione del fumo, che dovrebbe diventare parte integrante dello screening. In prima istanza, il semplice utilizzo di strumenti predittivi basati sulle caratteristiche dei noduli o dei pazienti può ridurre il tasso di falsi positivi;³¹ inoltre, un nuovo test non invasivo, che si avvale dell'utilizzo di biomarcatori riproducibili, potrebbe aiutare ulteriormente a identificare le forme tumorali più aggressive avviando, così, al problema della sovradiagnosi.

Studio MILD e progetto DANTE

Tra i vari studi europei che non hanno dimostrato una riduzione della mortalità mediante l'utilizzo della LDCT ve ne sono due italiani, lo studio MILD e il progetto DANTE.

■ Allo studio MILD ha fatto seguito l'analisi dei dati che ha permesso, come si vedrà meglio nei paragrafi successivi, l'identificazione di nuovi biomarcatori capaci di stratificare il rischio di tumore del polmone. Nello studio MILD, svoltosi tra il 2005 e il 2011 presso l'Istituto nazionale dei tumori di Milano, è stato proposto un doppio braccio di randomizzazione: i volontari iscritti, soggetti ad alto rischio con un storia di fumo (>20 pack-year) sono stati inizialmente randomizzati in due bracci: attivo *vs.* controllo; nel secondo, i soggetti venivano sottoposti a un programma di prevenzione primaria (incentivando la cessazione del fumo) associata a valutazione della funzionalità respiratoria e alla raccolta di campioni di sangue.¹⁷

Nel braccio attivo i volontari venivano sottoposti allo stesso programma con l'aggiunta di una LDCT; questi soggetti venivano, quindi, ulteriormente randomizzati a sottoporsi a LDCT con cadenza annuale *vs.* biennale. Dei 4.099 soggetti arruolati, 1.723 furono associati al braccio di controllo, 1.190 a una LDCT annuale e 1.186 a una LDCT biennale.

I tassi di mortalità per tumore polmone, *endpoint* primario dello studio, nei bracci di controllo, nel braccio LDCT annuale e nel braccio LDCT biennale sono stati, rispettivamente, 108,5/100.000, 216 e 108,8 in assenza di una differenza statisticamente significativa ($p = 0,21$) e con un *Hazard ratio* (HR) di 1,52 (IC95% 0,63-3,65) quando i due bracci di sorveglianza attiva LDCT sono stati uniti e confrontati con il gruppo di controllo.

Dopo aggiustamento per età e fumo, l'HR è risultato 1,64 (IC95% 0,67-4,01). I casi di tumore del polmone osservati nel braccio LDCT annuale sono stati più alti nei confronti del braccio LDCT biennale, senza evidenza di maggior riscontro di stadi più elevati nel braccio biennale, con ulte-

riore conferma del rischio di sovradiagnosi. Lo studio MILD è stato fondamentale nell'identificare e sviluppare una nuova generazione di biomarcatori ematici specifici per il polmone.

■ Nello studio DANTE, svoltosi presso l'Istituto Clinico Humanitas di Rozzano (Milano) tra il 2001 e il 2006, vennero arruolati 2.811 volontari ad alto rischio di cui iniziarono gli accertamenti dopo che furono randomizzati: 1.264 soggetti nel braccio LDCT e 1.186 nel braccio di controllo.

Al *baseline*, tutti venivano sottoposti a una RX torace + ricerca di cellule tumorali maligne (CTM) su espettorato; nel braccio attivo i soggetti eseguivano, nello stesso giorno della RX torace, una LDCT che veniva ripetuta con cadenza annuale per un totale di 5 anni.³² Tutti avevano effettuato un colloquio medico e un esame obiettivo.

La mortalità per tumore del polmone è risultata di 543 casi per 100.000 anni-persona (IC95% 413-700) nel braccio LDCT *vs.* 544 (IC95% 410-709) nel braccio di controllo (HR: 0,993; IC95% 0,688-1,433).

Lo studio ha messo in evidenza la percentuale di tumori polmonari più alta tra tutti gli screening (da considerare anche che la popolazione in oggetto era rappresentata solamente da uomini con un'età maggiore o uguale a 60 anni). E' stata riportata anche in questo studio una sovradiagnosi con riscontro di oltre il 30% di eccesso di tumori nel braccio LDCT *vs.* osservazione senza riscontrare modifiche sul tasso di mortalità tra i due bracci.

BIOMARCATORI NEL TUMORE POLMONARE

Diversi studi hanno considerato biomarcatori ematici per la diagnosi precoce del cancro del polmone. La maggior parte di loro, tuttavia, si occupa di studi di scoperta e validazione su serie cliniche retrospettive e solo pochi di loro hanno raggiunto uno screening prospettico. Un biomarcatore dovrebbe essere in grado di distinguere una forma di malattia aggressiva da quella indolente e avere, così, un impatto sulla mortalità per portare a un cambiamento nei trattamenti. Finora nessun biomarcatore diagnostico si è dimostrato utile nella rilevazione del cancro del polmone. Accanto a questioni tecniche legate alla difficoltà di standardizzazione di protocollo e alla mancanza di convalida su larga scala negli studi clinici, genetici e biologici, l'eterogeneità del tumore polmonare ha probabilmente limitato l'individuazione di marcatori specifici per tumore. Un modo innovativo per identificare nuovi e più affidabili biomarcatori è di mettersi alla ricerca di candidati, cercando non solo nel tumore stesso, ma anche nell'interazione, nel microambiente che si crea tra il tumore e l'ospite, con l'obiettivo di individuare cambiamenti precoci relativi alla reattività biologica dell'ospite. A questo proposito, i marcatori epigenetici, soprattutto microRNA circolanti

(miRNA), potrebbero essere candidati ideali, in quanto agiscono come messaggeri extracellulari di segnali biologici derivanti dalla comunicazione tra il tumore e il suo microambiente circostante.

miRNA circolanti

I miRNA sono brevi sequenze di RNA non codificante che regolano l'espressione genica legandosi a sequenze specifiche dell'RNA messaggero (mRNA), degradandolo o inibendone la traduzione. Un singolo miRNA può regolare centinaia di geni a valle che giocano un ruolo chiave nel corretto sviluppo e mantenimento degli organi. La loro deregolazione è stata osservata nei tumori come conseguenza di aberrazioni cromosomiche,³³ mutazioni,³⁴ polimorfismi³⁵ o cambiamenti epigenetici.³⁶ A seconda della loro espressione e di quella dei loro geni bersaglio, essi possono avere ruoli diversi in base ai tessuti: i miRNA possono, infatti, agire come oncogeni o soppressori tumorali regolando diverse funzioni biologiche, quali la proliferazione cellulare,³⁷ la differenziazione,³⁸ la migrazione,³⁹ l'apoptosi⁴⁰ e la regolazione del ciclo cellulare.⁴¹ Sono, inoltre, rilasciati in circolo inglobati in microvescicole ed esosomi o complessati a proteine. Questi miRNA circolanti sono fondamentali per la comunicazione cellula-cellula e, attraverso l'*uptake* endocitico o tramite recettori *scavenger*, sono in grado di mediare l'espressione genica dei target nelle cellule destinarie.⁴²⁻⁴⁶ E' stato anche dimostrato che miRNA contenuti in esosomi derivati dal sangue di pazienti con tumore al seno erano in grado di indurre cellule epiteliali normali a formare tumori.⁴⁷ Inoltre, grazie alla loro stabilità e facilità di misurazione, sono risultati ottimi biomarcatori per la diagnosi e la prognosi del cancro in diversi fluidi corporei, quali siero, plasma, urine e saliva.⁴⁸⁻⁵¹

Piattaforme per il rilevamento dei miRNA circolanti

Poiché i miRNA sono altamente stabili in campioni di plasma/siero,⁵² possono essere quantificati con metodi standard come la PCR quantitativa (qPCR), la tecnologia di ibridazione (*microarray*) o sequenziamento di nuova generazione (NGS).⁵³ Recentemente, Mestdagh e collaboratori hanno eseguito uno studio di controllo qualità (miRQC) su queste 3 tecnologie, analizzando 196 miRNA in campioni di tessuti e siero e valutando 7 parametri per determinare le prestazioni di 12 piattaforme disponibili in commercio.⁵⁴ Le piattaforme basate su NGS e *microarray* hanno dato risultati migliori per quanto riguarda la titolazione e avevano una più alta riproducibilità e specificità, mentre le piattaforme di qPCR erano più accurate e sensibili, quindi più idonee per le analisi di campioni con basse concentrazioni di miRNA, come i fluidi corporei.

Utilizzando queste tre tecniche, negli ultimi 5 anni sono stati pubblicati numerosi lavori che propongono test molecolari basati sui miRNA circolanti per la diagnosi e la prognosi del

SFIDE FUTURE PER ULTERIORI PROGRESSI NELLA POPOLAZIONE ARRUOLATA NELLO SCREENING

La sfida per il prossimo decennio consisterà nel portare i biomarcatori nella pratica clinica in modo che siano efficienti e pratici. A questo proposito, è di fondamentale importanza lo sviluppo di marcatori molecolari in grado di individuare i tumori in una fase di malattia pre-clinica e identificare la diversa aggressività dei tumori polmonari, inclusi quelli che si manifestano metastatici o anche le piccole lesioni con potenziale aggressivo. I profili dei miRNA circolanti che riflettono le condizioni fisiologiche o patologiche hanno il potenziale per superare la limitazione dei singoli biomarcatori ematici finora in uso clinico e possono avere un forte impatto sulla diagnosi precoce del cancro. Inoltre, anticipando la diagnosi clinica di uno o due anni, potrebbe cambiare significativamente il carico tumorale e migliorare l'efficacia delle terapie sistemiche.

STUDIO bioMILD

Nel 2013, presso la Fondazione IRCCS Istituto nazionale dei tumori di Milano è stato lanciato il progetto bioMILD, uno studio di screening prospettico basato sull'implementazione della LDCT con MSC. In 3 anni saranno arruolati 4.000 forti fumatori asintomatici di età superiore ai 50 anni senza storia oncologica negli ultimi 5 anni. I volontari vengono sottoposti a una LDCT e a un prelievo di sangue su cui sono effettuate indagini per identificare il profilo miRNA. Dall'elaborazione dei dati, utilizzando il classificatore MSC al soggetto viene attribuito un rischio di ammalarsi di tumore del polmone (L-mir: rischio basso; I-mir: rischio intermedio; H-mir: rischio elevato). L'integrazione di questa informazione con il risultato della LDCT dà indicazioni sulle indagini successive.

Sulla base dei risultati dello studio MILD, i noduli non calcifici identificati dalla LDCT sono classificati come negativi (<113 mm³), indeterminati (113-260 mm³) o positivi (>260 mm³). La LDCT viene valutata in modo indipendente da due radiologi esperti di patologia polmonare che si avvalgono dell'utilizzo di un software dedicato (*computer-aided diagnostic, CAD*) per l'identificazione e il calcolo volumetrico dei noduli non calcifici. L'algoritmo di screening è deciso in base alla combinazione dei risultati della LDCT con l'MSC (tabella 2). Poiché il valore predittivo negativo di MSC e LDCT insieme è stato del 99%,⁵⁷ se entrambi i test sono negativi i soggetti non ripetono ulteriori esami per i 3 anni successivi. La strategia diagnostica è stabilita in base alle dimensioni (ma anche tenendo conto di forma e posizione) del nodulo sospetto e il livello di rischio è dettato dal risultato del test MSC. La ripetizione della LDCT a 3 mesi o un anno è valutata in base alla presenza di un nodulo polmonare che, a seconda delle dimensioni, richiede una valutazione a breve o più lungo periodo. Nei casi di forte sospetto radiologico, prima della ripetizione

a tre mesi viene consigliata una terapia antibiotica empirica, indipendentemente dal risultato dell'MSC. Se il nodulo non si riduce, si procede con indagini più approfondite (TC *total body*, FDG-PET, agobiopsia polmonare).

Se i campioni di plasma risultano emolizzati o di scarsa qualità (15% previsto), i volontari sono invitati a ripetere il test MSC dopo 3 mesi.⁶²

Nei casi in cui la LDCT risulti negativa per noduli sospetti, il percorso successivo viene determinato dai miRNA che condizionano un controllo a lungo termine, dopo 3 anni nel caso si tratti di L-mir piuttosto che a 1 anno nel caso di I-mir. Il riscontro di H-mir, invece, necessita di essere riconfermato con un successivo prelievo eseguito dopo 3 mesi; qualora ciò avvenga, il soggetto è tenuto sotto stretto controllo radiologico mediante l'esecuzione sequenziale di indagini strumentali (RM torace, LDCT, FDG-PET) a tempi definiti, volti a identificare quanto prima la possibile insorgenza di una lesione morfologicamente identificabile. Come discusso nel lavoro di Boeri et al.,⁵⁵ i volontari che nel precedente screening MILD svilupparono il tumore al polmone, rivedendo retrospettivamente i campioni prelevati, avevano un profilo miRNA ad alto rischio fino a due anni precedenti all'insorgenza della malattia strumentale.

Forti della convinzione che, come in ogni screening, dovrebbe essere promossa un'abolizione dei fattori di rischio, durante il colloquio medico che si svolge all'appuntamento del *baseline*, a ogni partecipante con una storia di fumo attiva vengono proposti comportamenti di prevenzione primaria, partendo da poche e semplici informazioni e consigli per smettere di fumare, il cosiddetto *minimal advice*,

RISULTATI AL BASELINE	MSC BASSO (80%)	MSC INTERMEDIO (16%)	MSC ALTO (4%)	TEMPO DI RECALL
LDCT negativa (80%)	LDCT+MSC (65%)			3 anni
		LDCT+MSC (13%)		1 anno
			LDCT+MSC (3%)	3 mesi
LDCT indeterminata (16%)	LDCT+MSC (13%)			1 anno
		LDCT+MSC (3%)		1 anno
			LDCT+MSC (<1%)	3 mesi
LDCT positiva (4%)	LDCT+MSC (3%)	LDCT+MSC (<1%)	LDCT o PET +MSC (<1%)	3 mesi

MSC: classificatori della signature dei miRNA / *miRNA signature classifiers*

LDCT: Tomografia computerizzata a bassa dose / *Low-dose computed tomography*

Tabella 2. Disegno dello studio dello screening bioMILD. Percentuale di valori attesi in base ai risultati dello screening MILD.

Table 2. bioMILD screening trial study design. Expected percentage according to MILD trial results.

segnalandogli le possibilità terapeutiche e fornendogli concretamente indirizzi di riferimento territoriali per la cessazione del fumo. Viene, inoltre, eseguita una spirometria semplice con la valutazione dello stato funzionale respiratorio (misurazione della capacità vitale forzata – FVC, della capacità di espirazione forzata nel primo secondo – FEV1, del calcolo dell'indice di Tiffeneau) che permette l'identificazione di condizioni patologiche in taluni casi misconosciute. Viene, infine, eseguita una titolazione dell'esposizione al fumo mediante la misurazione del CO espirato, utilizzato come stimolo nel percorso di cessazione tabagica.

I dati ottenuti dall'analisi dello studio valuteranno la *performance* dei miRNA come test di prima linea all'interno di uno screening per il tumore polmonare.

CONCLUSIONI

L'implementazione di nuovi biomarcatori per il tumore del polmone, come i miRNA, ha portato a un'elevata sensibilità, specificità e valore predittivo negativo nella diagnosi di questa malattia quando utilizzati all'interno di un programma di screening LDCT. Oltre a poter predire la comparsa di una lesione tumorale fino a due anni prima dalla sua evidenza radiologica, l'MSC si è rivelato un fattore indipendente nella mortalità specifica per tumore del polmone; si è osservata una mortalità più alta nei pazienti con

profilo H-mir e più bassa nei pazienti con profilo L-mir. Lo studio italiano bioMILD rappresenta il primo tentativo di inserire in modo prospettico l'uso di questi biomarcatori circolanti, i miRNA plasmatici, nell'algoritmo diagnostico di partecipanti volontari forti fumatori sottoposti a screening con LDCT. L'utilizzo di queste piccole molecole, come messaggeri dell'interazione ospite-microambiente, circolanti, stabili, specifici per organo e tessuti, sembra l'approccio più informativo, precoce e sensibile. Ciò permetterà di fornire ai pazienti e alle loro famiglie una speranza che non è mai esistita prima nel campo del tumore del polmone. Come sulla base dello studio NLST, la United States Preventive Services Task Force (USPSTF), l'organismo sanitario degli Stati Uniti finanziato dalla Agency for Healthcare Research and Quality, e molte società professionali hanno raccomandato lo screening annuale LDCT per gli individui ad alto rischio, così, anche in Europa, in attesa dei risultati dei grandi trial randomizzati prospettici tuttora in corso, l'implementazione di modelli statistici dedicati all'identificazione di una popolazione a rischio e di biomarcatori selettivi probabilmente miglioreranno la diagnosi precoce, la sopravvivenza globale e il tasso di cura nel cancro del polmone.

Conflitti di interesse dichiarati: nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M et al. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide*. IARC CancerBase No. 11. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2013.
2. De Angelis R, Sant M, Coleman MP et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO-CARE-5 – a population-based study. *Lancet Oncol* 2014;15(1):23-34.
3. Crino L, Weder W, van Meerbeeck J, Felip E; ESMO Guidelines Working Group. Early stage and locally advanced (non-metastatic) non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014;21 Suppl 5:v103-15.
4. Vansteenkiste J, De Ruysscher D, Eberhardt WE et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013;24 Suppl 6:vi89-98.
5. National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR, Adams AM et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med* 2011;365(5):395-409.
6. Tockman MS. Survival and Mortality from Lung Cancer in a Screened Population: The Johns Hopkins Study. *Chest* 1986;89(4) Suppl:324S-325S.
7. Melamed MR, Flehinger BJ, Zaman MB, Heelan RT, Perchick WA, Martini N. Screening for early lung cancer. Results of the Memorial Sloan-Kettering study in New York. *Chest* 1984;86(1):44-53.
8. Fontana RS, Sanderson DR, Taylor WF et al. Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Mayo Clinic study. *Am Rev Respir Dis* 1984;130(4):561-5.
9. Oken MM, Hocking WG, Kvale PA et al. Screening by chest radiograph and lung cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) randomized trial. *JAMA* 2011;306(17):1865-73.
10. Midthun DE, Jett JR. Screening for lung cancer: the US studies. *J Surg Oncol* 2013;108(5):275-9.
11. Kaneko M, Eguchi K, Ohmatsu H et al. Peripheral lung cancer: screening and detection with low-dose spiral CT versus radiography. *Radiology* 1996;201(3):798-802.
12. Sone S, Takashima S, Li F et al. Mass screening for lung cancer with mobile spiral computed tomography scanner. *Lancet* 1998;351(9111):1242-5.
13. Henschke CI, McCauley DI, Yankelevitz DF et al. Early Lung Cancer Action Project: overall design and findings from baseline screening. *Lancet* 1999;354(9173):99-105.
14. International Early Lung Cancer Action Program Investigators, Henschke CI, Yankelevitz DF et al. Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening. *N Engl J Med* 2006;355(17):1763-71.
15. van Klaveren RJ, Oudkerk M, Prokop M et al. Management of lung nodules detected by volume CT scanning. *N Engl J Med* 2009;361(23):2221-9.
16. Saghir Z, Dirksen A, Ashraf H et al. CT screening for lung cancer brings forward early disease. The randomised Danish Lung Cancer Screening Trial: status after five annual screening rounds with low-dose CT. *Thorax* 2012;67(4):296-301.
17. Pastorino U, Rossi M, Rosato V et al. Annual or biennial CT screening versus observation in heavy smokers: 5-year results of the MILD trial. *Eur J Cancer Prev* 2012;21(3):308-15.
18. Becker N, Motsch E, Gross ML et al. Randomized study on early detection of lung cancer with MSCT in Germany: study design and results of the first screening round. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138(9):1475-86.
19. Lopes Pegna A, Picozzi G, Falaschi F et al. Four-year results of low-dose CT screening and nodule management in the ITALUNG trial. *J Thorac Oncol* 2013;8(7):866-75.
20. Infante M, Cavuto S, Lutman FR et al. A randomized study of lung cancer screening with spiral computed tomography: three-year results from the DANTE trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180(5):445-53.
21. Blanchon T, Bréchet JM, Grenier PA et al. Baseline results of the Depiscan study: a French randomized pilot trial of lung cancer screening comparing low dose CT scan (LDCT) and chest X-ray (CXR). *Lung Cancer* 2007;58(1):50-8.
22. Swensen SJ, Jett JR, Hartman TE et al. CT screening for lung cancer: five-year prospective experience. *Radiology* 2005;235(1):259-65.
23. Sobue T, Moriyama N, Kaneko M et al. Screening for lung cancer with

- low-dose helical computed tomography: anti-lung cancer association project. *J Clin Oncol* 2002;20(4):911-20.
24. Pastorino U, Bellomi M, Landoni C et al. Early lung-cancer detection with spiral CT and positron emission tomography in heavy smokers: 2-year results. *Lancet* 2003;362(9384):593-7.
 25. Diederich S, Wormanns D, Semik M et al. Screening for early lung cancer with low-dose spiral CT: prevalence in 817 asymptomatic smokers. *Radiology* 2002;222(3):773-81.
 26. Bach PB, Jett JR, Pastorino U, Tockman MS, Swensen SJ, Begg CB. Computed tomography screening and lung cancer outcomes. *JAMA* 2007;297(9):953-61.
 27. Field JK, van Klaveren R, Pedersen JH et al. European randomized lung cancer screening trials: Post NLST. *J Surg Oncol* 2013;108(5):280-6.
 28. Field JK, Smith RA, Aberle DR et al. International Association for the Study of Lung Cancer Computed Tomography Screening Workshop 2011 report. *J Thorac Oncol* 2012;7(1):10-9.
 29. Patz EF Jr, Pinsky P, Gatsonis C et al. Overdiagnosis in low-dose computed tomography screening for lung cancer. *JAMA Intern Med* 2014;174(2):269-74.
 30. McMahon PM, Kong CY, Bouzan C et al. Cost-effectiveness of computed tomography screening for lung cancer in the United States. *J Thorac Oncol* 2011;6(11):1841-8.
 31. Pastorino U, Sverzellati N. Lung cancer: CT screening for lung cancer – do we have an answer? *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10(12):672-3.
 32. Infante M, Cavuto S, Lutman FR et al. Long-Term Follow-up Results of the DANTE Trial, a Randomized Study of Lung Cancer Screening with Spiral Computed Tomography. *Am J Respir Crit Care Med* 2015;191(10):1166-75.
 33. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(9):2999-3004.
 34. Raveche ES, Salerno E, Scaglione BJ et al. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. *Blood* 2007;109(12):5079-86.
 35. Hu Z, Chen J, Tian T et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest* 2008;118(7):2600-8.
 36. Iorio MV, Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer J* 2012;18(3):215-22.
 37. Johansson J, Berg T, Kurzejamska E et al. MiR-155-mediated loss of C/EBPbeta shifts the TGF-beta response from growth inhibition to epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis in breast cancer. *Oncogene* 2013;32(50):5614-24.
 38. Wellner U, Schubert J, Burk UC et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol* 2009;11(12):1487-95.
 39. Ma L, Reinhardt F, Pan E et al. Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat Biotechnol* 2010;28(4):341-7.
 40. Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* 2010;467(7311):86-90.
 41. Hoffman Y, Bublik DR, Pilpel Y, Oren M. miR-661 downregulates both Mdm2 and Mdm4 to activate p53. *Cell Death Differ* 2014;21(2):302-9.
 42. Redis RS, Calin S, Yang Y, You MJ, Calin GA. Cell-to-cell miRNA transfer: from body homeostasis to therapy. *Pharmacol Ther* 2012;136(2):169-74.
 43. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 2010;285(23):17442-52.
 44. Yang M, Chen J, Su F et al. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol Cancer* 2011;10:117.
 45. Sozzi G, Pastorino U, Croce CM. MicroRNAs and lung cancer: from markers to targets. *Cell Cycle* 2011;10(13):2045-6.
 46. Fortunato O, Boeri M, Moro M et al. Mir-660 is downregulated in lung cancer patients and its replacement inhibits lung tumorigenesis by targeting MDM2-p53 interaction. *Cell Death Dis* 2014;5:e1564.
 47. Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell* 2014;26(5):707-21.
 48. Boeri M, Pastorino U, Sozzi G. Role of microRNAs in lung cancer: microRNA signatures in cancer prognosis. *Cancer J* 2012;18(3):268-74.
 49. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids – the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8(8):467-77.
 50. Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11(3):145-56.
 51. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 2011;39(16):7223-33.
 52. Chen X, Ba Y, Ma L et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008;18(10):997-1006.
 53. Uso M, Jantus-Lewintre E, Sirera R, Bremnes RM, Camps C. miRNA detection methods and clinical implications in lung cancer. *Future Oncol* 2014;10(14):2279-92.
 54. Mestdagh P, Hartmann N, Baeriswyl L et al. Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study. *Nat Methods* 2014;11(8):809-15.
 55. Boeri M, Verri C, Conte D et al. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(9):3713-8.
 56. Bianchi F, Nicassio F, Marzi M et al. A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer. *EMBO Mol Med* 2011;3(8):495-503.
 57. Sozzi G, Boeri M, Rossi M et al. Clinical utility of a plasma-based miRNA signature classifier within computed tomography lung cancer screening: a correlative MILD trial study. *J Clin Oncol* 2014;32(8):768-73.
 58. Veronesi G, Bellomi M, Mulshine JL et al. Lung cancer screening with low-dose computed tomography: a non-invasive diagnostic protocol for baseline lung nodules. *Lung Cancer* 2008;61(3):340-9.
 59. Montani F, Marzi MJ, Dezi F et al. miR-Test: a blood test for lung cancer early detection. *J Natl Cancer Inst* 2015;107(6):djv063.
 60. Sozzi G, Boeri M, Rossi M et al. Clinical utility of a plasma-based miRNA signature classifier within computed tomography lung cancer screening: a correlative MILD trial study. *J Clin Oncol* 2014;32(8):768-73.
 61. Veronesi G, Maisonneuve P, Spaggiari L et al. Diagnostic performance of low-dose computed tomography screening for lung cancer over five years. *J Thorac Oncol* 2014;9(7):935-9.
 62. Fortunato O, Boeri M, Verri C et al. Assessment of circulating microRNAs in plasma of lung cancer patients. *Molecules* 2014;19(3):3038-54.