



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA

FISIOPATOLOGIA ED IMAGING CARDIO-TORACO VASCOLARE

Coordinatore: prof. Pasquale Pignatelli

**IMPATTO DEL DNA TUMORALE CIRCOLANTE E DNA LIBERO CIRCOLANTE SU
DIAGNOSI PRECOCE DI TUMORE AL POLMONE IN PAZIENTI CON RISCONTRO
RADIOLOGICO DI *GROUND GLASS OPACITY* (GGO)**

Candidato: Dott. Massimiliano Bassi

Relatore: Prof. Marco Anile

*Alle mie sorelle,
esempio di come amare il proprio lavoro ti renda ogni giorno una persona migliore*

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
2. GROUND GLASS OPACITY (GGO).....	7
2.1 Definizione, epidemiologia e classificazione.....	7
2.2 Fisiopatologia e significato clinico.....	9
2.3 Caratteristiche predittive di malignità nelle GGOs	13
2.4 Linee Guida sul management delle GGOs	14
2.5 Prognosi nelle GGOs maligne	17
3. IL DNA CIRCOLANTE	20
3.1 Definizione e patologia clinica	20
3.2 il DNA tumorale circolante (ctDNA)	22
3.3 Biopsia liquida	23
3.4 Applicazioni cliniche della biopsia liquida nel tumore al polmone	25
3.5 Ruolo del ctDNA nella diagnosi precoce di cancro del polmone	27
4. MATERIALI E METODI	29
5. RISULTATI	33
6. DISCUSSIONE	40
7. CONCLUSIONI	42
8. BIBLIOGRAFIA	43

1. INTRODUZIONE

Il tumore del polmone rappresenta la prima causa di morte cancro-relata al mondo. Le regioni con elevato consumo di tabacco e fattori di rischio ambientali presentano la maggiore incidenza, sebbene l'epidemiologia del cancro al polmone sia ubiquitaria e si stia evolvendo assieme ai cambiamenti di stile di vita della popolazione. La diffusione delle TC a basso dosaggio di radiazioni negli ultimi anni ha cambiato drasticamente la storia della malattia, permettendo di individuare la neoplasia in uno stadio precoce. Tuttavia, è aumentato anche il reperto occasionale di opacità polmonari a vetro smerigliato (Ground Glass Opacities – GGOs) che rappresentano una vera e propria sfida diagnostica in termini di diagnosi differenziale tra patologia benigna e maligna. Le GGO sono delle anomalie radiologiche caratterizzate da un rinforzo pseudonodulare della architettura del parenchima polmonare, senza tuttavia oscurare le strutture bronchiali o vascolari sottostanti. Nonostante la maggior parte delle GGOs siano patologie benigne, una percentuale non trascurabile, che varia tra il 10 – 37%, risulta essere un tumore polmonare allo stadio precoce, più frequentemente un adenocarcinoma con pattern di crescita lepidico, o lesioni precancerose, come l'iperplasia adenomatosa atipica o l'adenocarcinoma in situ, offrendo una finestra di opportunità per un trattamento curativo. Le attuali linee guida internazionali raccomandano un follow up radiologico a 3-6 mesi ed una successiva rivalutazione TC per determinarne l'andamento evolutivo. Nei casi sospetti è poi indicato un approccio più invasivo quale biopsia transtoracica o intervento chirurgico. In questo modo la diagnosi viene effettuata molti mesi dopo il primo riscontro diagnostico e molti

pazienti vengono sottoposti ad intervento chirurgico di resezione polmonare senza una diagnosi preoperatoria.

L'utilizzo della "biopsia liquida" mediante cellule tumorali circolanti (CTC) o ctDNA nel tumore del polmone sta assumendo sempre più importanza soprattutto nei tumori allo stadio avanzato come biomarker di risposta alla terapia. Tuttavia, il loro ruolo nel tumore polmonare allo stadio precoce è ancora poco studiato. Il ctDNA è costituito da frammenti di DNA che vengono rilasciati nel torrente circolatorio dalle cellule tumorali a seguito di necrosi, apoptosi o secrezione esogena. La maggior parte dei ctDNA ha una dimensione compresa tra le 160 e 200 coppie di basi e può essere estratto dal sangue dei pazienti mediante varie tecniche di amplificazione. Alcuni recenti studi hanno dimostrato che il ctDNA è presente nel sangue periferico di pazienti con tumore polmonare allo stadio precoce. Tuttavia, non ci sono ancora studi sulla presenza o meno di ctDNA nei pz con GGO e se questo possa essere utilizzato come biomarker di malignità.

Obiettivo generale del progetto è la diagnosi precoce e con tecniche non invasive del cancro del polmone. In particolare, obiettivo specifico dello studio è valutare della presenza o meno di DNA tumorale circolante (*circulating tumor DNA* - ctDNA) su sangue periferico di pazienti con riscontro TC di opacità polmonari a vetro smerigliato (*ground glass opacity* - GGO) e l'importanza che questo dato può assumere nell'iter diagnostico/terapeutico. La valutazione del ctDNA verrà effettuata al primo riscontro radiologico ed in seguito correlata con la malignità o meno della lesione in base ai criteri radiologici/istologici regolarmente utilizzati nel nostro istituto.

Obiettivo secondario è la valutazione della quantità totale di DNA libero circolante (cfDNA) come marcatore biologico di malignità.

2. GROUND GLASS OPACITY (GGO)

2.1 Definizione, epidemiologia e classificazione

Le ground glass opacities (GGOs) o opacità polmonari a vetro smerigliato, sono definite, in accordo con la Fleischner Society (1), come aree di aumentata opacità polmonare alle immagini TC che non oscurano le sottostanti strutture bronchiali e vascolari. Tale caratteristica le distingue dalle consolidazioni o noduli solidi polmonari le quali impediscono il riconoscimento radiologico delle strutture sottostanti.

Negli ultimi anni l'avvento della TC a basso dosaggio nella pratica clinica, ed in particolar modo nello screening del tumore del polmone, ha portato ad un riscontro occasionale sempre più frequente di GGOs (2-5).

Ad oggi ci si riferisce ai reperti GGOs anche con il termine di “noduli sub-solidi”, sottolineando la loro diversa densità radiologica nei confronti dei tipici noduli polmonari che vengono definiti “solidi”.

Secondo diversi studi, le GGO sono più frequenti in pazienti donne, non fumatrici ed asiatiche, anche se quest'ultimo dato potrebbe presentare un bias di selezione dato dal maggior numero di studi sull'argomento provenienti dal continente asiatico (5-7). Una ampia metanalisi condotta da Li X et al (8) analizzando i dati di più di 8000 pazienti da 53 studi conclude tuttavia confermando il fatto che la maggior parte dei GGO maligni colpiscono le donne giovani non fumatrici, invertendo di fatto l'epidemiologia del cancro al polmone in cui gli uomini fumatori sono i soggetti più ad alto rischio.

Dal punto di vista classificativo dobbiamo distinguere tra i noduli puramente subsolidi (pure GGO) e i noduli con core centrale solido e alone periferico a vetro smerigliato (mixed GGO). Questa classificazione, proposta per la prima volta nel 2002 da Henschke et al. (9) è stata poi ampliata da Suzuki et al. (10) che nel 2008 proposero un sistema di classificazione più dettagliato di tali noduli, riconducendoli a 6 tipologie:

Tipo1 - GGO pura; Tipo 2 - GGO omogenea a densità incrementata; Tipo 3 – nodulo misto con porzione solida omogenea e < 50% con area GGO attorno (Halo Sign); Tipo 4 – nodulo misto con componente solida e GGO disomogenee ma comunque con parte solida < 50%; Tipo 5 – nodulo misto con parte solida > 50%; Tipo 6 – nodulo solido (Tabella 1).

Tale suddivisione tuttavia è scarsamente usata nella pratica clinica per via della sua complessità.

Type 1	Pure (simple) GGO
Type 2	Semiconsolidation (an area of intermediate homogeneous increase in density)
Type 3	Halo (area consisting of solid part and surrounding GGO halo)
Type 4	Mixed (an area consisting of GGO and solid part having air-bronchogram)
Type 5	Solid pattern > 50% with GGO
Type 6	Solid nodule

Tabella 1. Classificazione Ground Glass Opacities secondo Suzuki et al. (10)

Attualmente le linee guida internazionali (11) prendono in considerazione la presenza di GGOs pure o non solide (pGGO) e miste o parzialmente solide (mGGO). In queste ultime è possibile calcolare il consolidation-tumor ratio (C-T ratio), ossia il rapporto tra la porzione solida e quella sub-solidi. Questo rapporto è risultato essere fortemente associato alla malignità delle GGOs specialmente se superiore a 0.5 (12). Più recentemente sono stati

proposti nuovi sistemi classificativi per il C-T ratio comprendenti l'analisi del volume tumorale in 3D piuttosto che l'analisi 2D sulle immagini TC (13).

2.2 Fisiopatologia e significato clinico

La base fisiopatologica delle immagini TC ad opacità a vetro smerigliato è da ricondurre ad una parziale riduzione del volume aereo per limitata oblitterazione del lume alveolare. Tale fenomeno potrebbe essere spiegato da diversi meccanismi quali il progressivo accumulo di cellule e liquido nel lume alveolare, l'ispessimento interstiziale o la proliferazione di cellule tumorali con pattern di crescita lepidica (14). In questo particolare tipo di crescita tumorale, si hanno cellule tumorali che proliferano lungo la parete alveolare, senza distruzione della struttura stessa.

Con l'aumentare di dimensioni della lesione, la struttura alveolare collassa, portando a proliferazione fibroblastica e ad un contestuale aumento della componente solida, evolvendo dunque verso la tipologia di mGGOs. Nei casi di GGO maligna, la comparsa dell'area di consolidazione solida centrale segna in genere il passaggio da una forma in situ o minimamente invasiva a d una completa invasione della membrana basale e di conseguenza ad una forma infiltrante (15).

Numerosi studi negli anni si sono incentrati sul correlare la presenza di GGO a dei pattern patologici specifici. Ad oggi è noto che il reperto TC di GGO non è specifico giacché rispecchia la presenza di numerose affezioni polmonari, tendenzialmente benigne di natura flogistica (14-17). Tuttavia, in una percentuale di casi variabile tra il 10 e il 37%, le GGOs possono essere l'espressione radiologica di un tumore polmonare (17-19).

Poter attuare una distinzione di GGO benigne e maligne sulla sola base radiologica è estremamente difficile e soprattutto non accurato.

Il miglior approccio comprende una valutazione a tutto tondo della sintomatologia del paziente e delle caratteristiche evolutive temporali delle lesioni. Ad esempio, nei pazienti con primo riscontro di GGOs ad una HRCT toracica è fondamentale indagare elementi quali la concomitanza insorgenza di sintomatologia, l'abitudine tabagica, anamnesi personale di fibrosi polmonare ecc.

Nei pazienti con sintomatologia ad esordio acuto (nell'arco di 7-10 giorni dal riscontro radiologico) o sub acuto (10-30 giorni) la diagnosi differenziale è fortemente incentrata su patologie benigne del parenchima polmonare. Esempi di quest'ultime sono le infezioni virali acute, le emorragie, l'edema polmonare e le esacerbazioni di preesistenti interstiziopatie (17).

Le polmoniti, specialmente quelle di natura virale (SARS-COV-2, virus dell'influenza e i suoi ceppi più aggressivi H1N1 e H5N1) e quelle atipiche, tendono a presentarsi alla HRCT con quadri eterogenei di aree diffuse di GGOs multifocali, associate a consolidazioni, linfadenomegalie, cavitazioni ed effusioni pleuriche (20-22). Le emorragie polmonari avranno alterazioni radiologiche differenti a seconda della causa sottostante: contusioni o lesioni

iatrogene possono presentarsi come una GGO focale e unilaterale mentre emorragie causate da vasculiti, indotte dall'abuso di droga o da terapia anticoagulante mostrano spesso un diffuso interessamento bilaterale.

Altra comune causa eziologica è l'edema polmonare, specialmente quello di natura idrostatica, la cui manifestazione radiologica cardine risulta essere un quadro di estese aree GGOs, centrali e peri-ilari, accompagnate spesso da segni di effusione pleurica, cardiomegalia ed ispessimento dei setti interlobulari (23).

In ultimo, la fibrosi polmonare idiopatica (IPF) ed altre interstiziopatie polmonari causano pattern radiologici caratterizzati da diffuse e bilaterali GGOs (24).

Tra le patologie benigne poste in diagnosi differenziale abbiamo anche le polmoniti organizzate e la tossicità da farmaci. In quest'ultimo caso, il quadro ricalca quello delle polmoniti organizzate con associazione di GGOs multifocali e consolidazioni che spesso seguono la distribuzione bronco-alveolare. (25).

Al contrario, reperti GGOs accidentali in pazienti asintomatici, specialmente se persistenti nel tempo o a lenta evoluzione, più frequentemente rappresentano la manifestazione radiologica di neoplasie polmonari in stadio precoce.

Le neoplasie polmonari possono manifestarsi sia come GGO pure che come GGO miste. Le GGO pure sono più frequentemente espressioni di patologie precancerose (come, ad esempio, l'iperplasia adenomatosa atipica - AAH) oppure di tumori polmonari allo stadio molto precoce (come ad esempio adenocarcinoma in situ - AIS, adenocarcinoma minimamente invasivo - MIA, adenocarcinoma a patter di crescita lepidico o bronchioloalveolare - BAC). Al contrario le GGO miste oppure i noduli solidi con halo sign più frequentemente rappresentano tumori polmonari con componente invasiva.

L'associazione tra le GGOs e l'adenocarcinoma polmonare allo stadio iniziale fu per la prima volta riportata negli anni '90 da ricercatori coreani e giapponesi (26 - 27). Da quel momento, numerose pubblicazioni scientifiche si sono incentrate sul significato oncologico delle GGOs (28-31).

Attualmente è largamente riconosciuta l'associazione tra GGOs e tumore polmonare in stadio precoce, più frequentemente adenocarcinoma.

In un recente studio retrospettivo, in cui sono stati analizzati dati provenienti da pazienti sottoposti a chirurgia per tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC) in stadio I, ben il 42.81% dei 2775 pazienti presentava manifestazioni radiologiche di noduli sub-solidi, precisamente il 18.31% sotto forma di mixed GGO e il 24.50% sotto forma di GGOs puri. Nel medesimo studio viene anche dimostrato come la presenza della componente a vetro smerigliato rappresenti una prognosi favorevole, con il gruppo di GGOs puri che presentava il 98.8% di sopravvivenza a 5 anni (32).

Considerato l'altissimo tasso di sopravvivenza per questi tumori in stadio precoce sottoposti a chirurgia, risulta essenziale poter discriminare in maniera il più possibile affidabile, tra GGO da patologie benigne e GGO da patologia maligna.

Polmoniti (virali, atipiche, infiammatorie)	Proteinosi alveolare
Emorragie polmonari	Pneumopatia acuta da farmaci
Edema polmonare	Iperplasia adenomatosa atipica
Fibrosi polmonare idiopatica	Adenocarcinoma polmonare

Tabella 2. Possibili cause eziologiche di Ground Glass Opacities

2.3 Caratteristiche predittive di malignità nelle GGOs

Numerosi autori hanno cercato negli ultimi anni di correlare la presenza di determinate caratteristiche delle GGOs con la malignità della lesione per poterne ottenere una diagnosi precoce di cancro del polmone e mettere in atto un management specifico.

Ad oggi molteplici studi confermano come la forma non poligonale della lesione GGO (ovale, tondeggiante o grossolanamente lobulata) insieme a margini ben definiti e ad una crescita radiale nel tempo rappresentino elementi radiologici correlabili a forme di adenocarcinoma polmonare in stadio precoce o invasivo (31-35). Queste lesioni vengono spesso definite con ground glass nodules (GGNs) per distinguerli dalle opacità mal definite e spesso di forma poligonale tipici delle malattie benigne.

Sulla dimensione delle lesioni GGOs come fattore predittivo di malignità non vi è ancora una visione condivisa. Se negli studi di Infante et al. (31) e McWilliams et al. (34) la dimensione dei reperti, a prescindere dalla loro composizione, non risulta essere un fattore predittivo, Lee et al. (35) e Takahashi et al. (36) riportano, invece, come una lesione GGO pura con diametro $> 8\text{mm}$ $> 10\text{ mm}$, rispettivamente, sia sospetta di eziologia maligna. Gli autori concordano sul fatto che l'assenza di un core denso, una forma poligonale e margini mal definiti sono associati a GGOs benigne, non evolutive, le quali più spesso si presentano bilaterali e multiple, in maniera opposta rispetto ai GGN.

La composizione interna della lesione è risultata essere un fattore predittivo molto importante. Nella valutazione delle GGOs sia pure che miste emerge che la probabilità che una pGGO sia maligna è del 18% contro il 63% delle mGGO (36).

La stessa Fleischner Society riporta come una componente solida superiore agli 8 mm in una GGO sia un fattore predittivo molto forte di malignità (11).

Nonostante alcune caratteristiche di forma e densità della lesione possa suggerire una eziologia benigna o maligna, è l'andamento temporale di tale lesione al follow up radiologico che più guida nella diagnosi differenziale. Infatti la maggior parte delle lesioni GGOs sono transienti, regredendo spontaneamente dopo un periodo variabile. Specificatamente il 37% delle GGOs pure e il 48% delle miste sparisce nell'arco di tre mesi. Tra i noduli GGO persistenti, nell'ambito di un follow up a lungo termine di 3 anni, solamente il 26% va incontro ad un aumento di diametro significativo (sopra i 2 mm).

Di conseguenza, oltre a determinate caratteristiche radiologiche e di rischio del paziente, è il follow up radiologico con HRCT lo strumento più efficace che attualmente abbiamo per derimere tra GGOs benigne e maligne.

Strumenti emergenti, quali algoritmi combinati di radiomica e machine learning, seppur promettenti, ad oggi non permettono un riconoscimento effettivo della patologia maligna rispetto a quella benigna (38-40). Infatti la loro applicazione presenta ancora numerose limitazioni, quali la non riproducibilità degli algoritmi in base ai differenti tipi di acquisizione delle immagini e la difficoltà di diffusione su larga scala.

2.4 Linee Guida sul Management delle GGOs

Il principale problema che il clinico si trova ad affrontare nel momento in cui riscontra la presenza di tali reperti riguarda il loro successivo management. Nel 2017, la Fleischner Society (11) ha pubblicato le ultime raccomandazioni sul management dei noduli

sub-solidi. Allo stesso modo, la British Thoracic Society (Baldwin) nel 2015 ha pubblicato le linee guida sull'investigazione e il management dei noduli polmonari, sia solidi che sub-solidi. Il fine ultimo delle attuali linee guida internazionali è quello di indirizzare pazienti con GGOs ad alto sospetto di malignità verso un riscontro istologico mediante ago biopsia polmonare TC guidata oppure, quando non effettuabile, mediante biopsia chirurgica con escissione della lesione; i pazienti con GGOs basso-intermedio sospetto di malignità saranno invece seguiti mediante follow-up radiologico (Figura 1).

Subsolid	Size	Follow up
 Groundglass	< 6 mm	No FU indicated
	≥ 6 mm	CT at 6-12 months to confirm persistence, then CT at 3 and 5 years
 Part-solid	< 6 mm	No FU indicated
	≥ 6 mm	CT at 3-6 months to confirm persistence, then annual CT for 5 years
 Multiple	< 6 mm	CT at 3-6 months. If stable CT at 2 and 4 years
	≥ 6 mm	CT at 3-6 months. Subsequent management based on most suspicious nodule

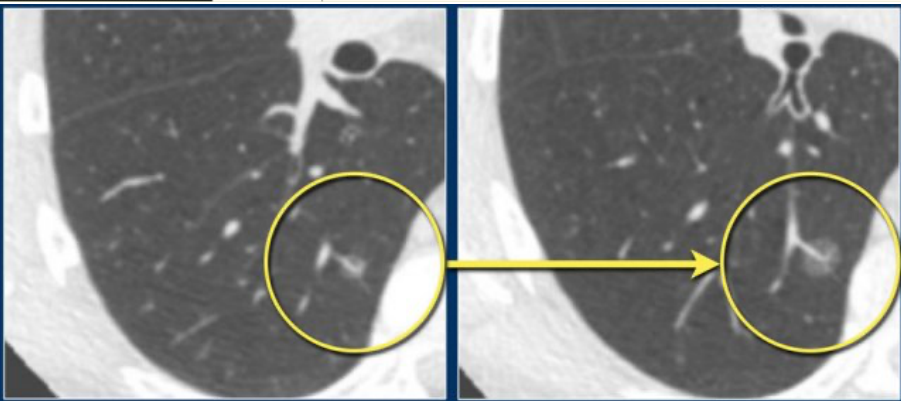


Figura 1. Linee guida sull'investigazione e il management dei noduli polmonari subsolidi secondo la Fleischner Society (11)

Entrambe le linee guida si basano principalmente sulle dimensioni delle lesioni riscontrate: quando le dimensioni sono > 5 o 6 mm è indicato un follow-up con TC torace a breve termine (3-6 mesi); se le dimensioni risultano essere < 5 mm, il follow-up non è raccomandato, soprattutto per le pGGOs.

Se nell'ambito del follow-up a breve termine viene confermata la persistenza del nodulo, sia la Fleischner Society che la British Thoracic Society concordano sul prolungamento del follow-up con sorveglianza TC annuale per 5 e 4 anni, rispettivamente.

La maggior parte dei noduli GGOs non va incontro a modifiche in termini di crescita sia volumetrica che lineare. In uno studio in cui vengono prese in considerazione 122 GGOs diagnosticati tramite screening, il 90% di queste ultime rimane stabile durante il follow-up a lungo termine (media del follow up, 59 mesi) (42).

Nelle raccomandazioni della BTS per stimare il rischio di noduli sospetti (≥ 5 mm o stabile per 3 mesi) si fa riferimento all'algoritmo di Broke. Quest'ultimo si basa su fattori quali età, sesso, storia di fumo di sigaretta, familiarità positiva per tumore al polmone, enfisema e tutte le caratteristiche radiologiche sospette di una GGO, per stilare una predizione del rischio di evoluzione maligna di quel nodulo. Se la percentuale di rischio risulta essere inferiore al 10%, il paziente potrà continuare il follow up radiologico; qualora il rischio risultasse superiore al 10% il paziente sarà indirizzato ad esami diagnostici più invasivi, ai fini di una diagnosi istologica.

Nelle linee guida della Fleischner Society i noduli GGOs che necessitano di riscontro istologico sono principalmente delineati sulle caratteristiche radiologiche di malignità viste precedentemente senza considerare i fattori di rischio specifici del paziente.

Inoltre, mentre nelle linee guida dei noduli solidi polmonari trova spazio anche l'impiego della PET-TC con elevato valore predittivo negativo, lo stesso esame strumentale non trova raccomandazioni nella valutazione dei noduli sub-solidi o non solidi, per via della sua limitata sensibilità nei confronti di lesioni di piccole dimensioni (< 1 cm) e con aspetto di opacità a vetro smerigliato (18).

In conclusione, a seguito di adeguato follow up radiologico, le lesioni che presentano un aumentato rischio di rappresentare una patologia maligna saranno indirizzati a biopsia, quelli a basso rischio saranno mantenuti sotto follow up radiologico. L'intervento chirurgico, in fase diagnostica, viene riservato esclusivamente alle lesioni ad alto rischio di malignità che non possono essere biopsiate con altre metodiche quali la biopsia percutanea o transbronchiale.

2.5 Prognosi nelle GGO maligne

Molti autori hanno dimostrato come la prognosi sia migliore nei pazienti con adenocarcinoma a maggior componente sub-solido alla TC, indipendentemente dalle dimensioni del tumore (43-45). Infatti la presenza di una cospicua componente solida correla maggiormente ad un adenocarcinoma polmonare invasivo e all'aggressività della neoplasia. Il riscontro di adenocarcinoma senza invasione stromale predomina nelle pGGOs, mentre l'adenocarcinoma invasivo diventa più frequente nelle mGGOs, contestualmente all'incremento della componente solida della lesione. Precisamente, l'87% delle GGOs senza o con minimo core solido è associato ad adenocarcinoma nel suo stadio più precoce (AIS,

MIA) mentre in una percentuale variabile tra il 56 e il 91% delle mixed GGOs si rivela essere un adenocarcinoma in stadio invasivo (47).

In questi pazienti il trattamento chirurgico standard è rappresentato dall'exeresi polmonare.

Nei pazienti sottoposti a resezione chirurgica la maggior differenza prognostica fra coloro che presentano GGOs e chi presenta noduli misti: in termini di Recurrence Free Survival (RFS) il 100% nei pazienti con pGGOs non mostra recidiva a 5 anni, contro l'87.6% nei pazienti con mGGOs e 73.2% nei pazienti con noduli solidi al I stadio di malattia (6).

Tali dati sono riconducibili al fatto che nella maggior parte dei pazienti con adenocarcinoma polmonare sottoforma di aree di opacità a vetro smerigliato puro la diagnosi è di adenocarcinoma minimamente invasivo o adenocarcinoma in situ senza coinvolgimento vascolare e linfonodale.

Per quanto riguarda l'estensione del trattamento chirurgico da riservare ai pazienti con GGO maligna, ci sono ancora controversie. Infatti, mentre la lobectomia polmonare rimane ancora il gold standard terapeutico per i pazienti con tumore al polmone, negli ultimi anni 2 importanti studi randomizzati hanno dimostrato l'efficacia delle resezioni sublobari (ed in particolare della segmentectomia) nel trattamento di tumori al I stadio con diametro massimo inferiore ai 2 cm (47-48).

Attualmente, secondo le linee guida della NCCN (49), le resezioni limitate sono raccomandate nelle lesioni GGOs periferiche con dimensione < 2cm e con più del 50% di componente a vetro smerigliato; nei restanti casi la lobectomia è ancora indicato come intervento di scelta se funzionalmente tollerata dal paziente.

In conclusione, il riscontro TC delle opacità a vetro smerigliato sta diventando sempre più frequente per la diffusione delle TC Torace ad alta risoluzione e sta assumendo un ruolo sempre più importante nella pratica clinica oncologica.

Una attenta analisi clinico-radiologica e un corretto follow up permettono di identificare tumori polmonari allo stadio precoce e di permettere un trattamento curativo.

Tuttavia, non esistono degli strumenti validi ancora per poter distinguere le lesioni GGO ad alto rischio di malignità da quelle a basso rischio. Di conseguenza la diagnosi viene spesso fatta dopo mesi o anni di follow up radiologico, ritardando così un potenziale intervento precoce.

3. IL DNA CIRCOLANTE

3.1. Definizione e fisiopatologia clinica

Quando ci si riferisce a DNA circolante in ambito oncologico dobbiamo distinguere tra due diverse entità: il DNA libero circolante (circulating free DNA – cfDNA o cDNA) e il DNA tumorale circolante (tumor circulating DNA – ctDNA).

Il DNA libero circolante (cfDNA – cell free DNA) è costituito da frammenti di DNA rilasciati nel torrente circolatorio dalle cellule dell'organismo durante i fisiologici o patologici processi di apoptosi e necrosi.

La presenza di acidi nucleici liberi nel sangue umano fu descritta per la prima volta da Mandel e Metais (50) nel 1948 in pazienti sani, ma fu solo nel 1966 grazie allo studio di Tan et al. (51) che se ne definì il carattere innovativo dal punto di vista clinico, dimostrando la presenza di elevati livelli di DNA libero circolante nel siero e nel plasma di pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico. In seguito, numerosi studi sono stati condotti alla ricerca della presenza e del valore degli acidi nucleici liberi in molteplici patologie.

Un possibile ruolo del cfDNA in ambito oncologico iniziò ad ipotizzarsi nel 1977 quando i ricercatori Leon te al. (52) constatarono la presenza di elevati livelli di tale marker in pazienti affetti da neoplasia rispetto ai livelli riscontrati in individui sani, aprendo la strada a potenziali applicazioni bio-mediche. Tuttavia, a causa delle limitate tecnologie di quegli anni, l'effettiva patogenesi dell'aumento del cfDNA in pazienti affetti da tumore non è stata adeguatamente dimostrata fino alla fine degli anni '90 quando due studi riportarono come questa fosse dovuta alla presenza di DNA tumorale in frammenti (53-54); da quel momento

l'origine del ctDNA dalle cellule del tumore primario è stato ampiamente dimostrato dai successivi studi.

La natura chimerica del cfDNA (data dalla presenza di cfDNA normale e di cfDNA associato a una determinata condizione clinica) può limitare il livello di rilevamento della proporzione relativamente piccola di cfDNA clinicamente significativo rispetto a quello normale (Snyder). Tuttavia, è anche questa proprietà che ha permesso lo sviluppo di tecnologie sempre più avanzate che ne hanno permesso l'applicazione in varie condizioni parafisiologiche e patologiche, con particolare successo nel rilevamento del cfDNA fetale durante la gravidanza (55), nell'infarto miocardico (56) e nella gravità dell'ictus cerebri (57). Ad oggi è noto che il cfDNA raccoglie nella sua denominazione frammenti di DNA provenienti da contesti diversi tra cui il DNA mitocondriale libero (mtDNA), il DNA di derivazione tumorale (ctDNA) e il DNA di derivazione fetale (fdDNA). Tuttavia, è importante evidenziare come tutti abbiano alcune proprietà simili. Di fatti, si tratta di DNA altamente frammentato a doppio filamento, di circa 170 – 500 bp (base pair – coppie di basi), presente nel plasma e rapidamente degradato, con un'emivita di circa 30 minuti - 2 ore (54, 58). Le concentrazioni di cfDNA variano ampiamente sia in condizioni fisiologiche normali (~7-18 ng/ml nei controlli sani) sia in condizioni patologiche (~800 ng/ml nei pazienti affetti da cancro esofageo) (59). Tali valutazioni sono state però complicate dalla fluttuazione apparentemente casuale della concentrazione del cfDNA su dei livelli base ancora sconosciuti. Inoltre, il livello di cfDNA può subire grandi variazioni anche a seguito di condizioni parafisiologiche, come ad esempio nel caso di esercizio fisico prolungato (60). Una caratteristica importante del cfDNA è il suo rapido turnover, che può suggerire un processo di rilascio continuo da parte di cellule apoptotiche e/o necrotiche. Negli individui sani, gli aumenti di cfDNA indotti dall'esercizio fisico si stabilizzano circa 30 minuti dopo lo sforzo e tornano alla normalità dopo altri 30 minuti, dimostrando una rapida clearance del cfDNA (61). Mentre la cinetica di clearance è ben documentata, gli esatti meccanismi di clearance sono ancora poco conosciuti.

Per ciò che concerne la dimensione dei frammenti di cfDNA, quella osservata più spesso nell'intervallo di 170-500 bp corrisponde al numero di coppie di basi avvolte attorno ad un

singolo nucleosoma, assieme alla presenza di un frammento di legame. Il nucleosoma rappresenta appunto l'unità fondamentale della cromatina ed è un complesso costituito da DNA cromosomico e proteine istoniche.

Numerosi studi hanno successivamente confermato come la struttura del cfDNA sia assimilabile a quella del DNA degradato dalle cellule apoptotiche, avvalorando la tesi per cui l'apoptosi rappresenti la principale via di immissione in circolo del cfDNA (62-63).

Inoltre, sono stati osservati frammenti di cfDNA ultrabrevi, fino a 40 bp, così come frammenti di cfDNA di lunghezza elevata, fino a 80.000 bp, in individui sani ma l'origine esatta e il meccanismo di rilascio di questi frammenti di cfDNA non sono ancora noti (53, 64).

3.2 il DNA tumorale circolante (ctDNA)

Il ctDNA rappresenta una quota frammentata di acidi nucleici riscontrati di origine tumorale nel sangue periferico di pazienti affetti da tumore. Circola nel plasma di tali pazienti sotto forma di piccoli frammenti di dimensioni di circa 160-200 bp (65).

Nonostante i progressi in tale ambito siano stati abbastanza rapidi, non è ancora chiaro l'esatto meccanismo con cui il ctDNA viene immesso in circolo. L'origine di questa forma di DNA circolante sembra essere riconducibile a tre principali fattori (66-68):

- Dalla lisi delle cellule tumorali, andate incontro ad apoptosi o necrosi;
- Dalla secrezione attiva di macrofagi che hanno fagocitato cellule tumorali necrotiche;
- Dalla degradazione delle cellule tumorali circolanti (CTC)

Inoltre, è stato dimostrato come il ctDNA circoli principalmente all'interno di vescicole extracellulari di grosse dimensioni (1-10µm di diametro), chiamate Large Extracellular vesicles (L-EV) (69).

Va comunque considerato che il ctDNA è solo una frazione minima frazione del cfDNA totale, con percentuali estremamente variabili, ma generalmente inferiori all'1% nei tumori in fase iniziale e fino al 20-40% nei tumori in stadio avanzato (70). Lo studio di Bettgowda te al. (71), ha dimostrato come la percentuale di ctDNA rifletta lo stadio della malattia in

atto, con valori detectabili di ctDNA in più del 75% dei pazienti con tumori in stadio avanzato ma percentuali inferiori per gli stadi localizzati di cancro del colon (73%), stomaco (57%), pancreas (48%) e mammella (50%). Per cui non sorprende che quantità più elevate di ctDNA siano associate alla riduzione della sopravvivenza globale nei pazienti affetti da neoplasia in quanto in parte rappresentano lo stadio di avanzamento della malattia, ed in parte potrebbero essere espressione di una aggressività biologica maggiore (72).

Tuttavia, sebbene la quantità di ctDNA tenda ad essere proporzionale al carico tumorale, si è osservata grande variabilità di espressione anche in pazienti con lo stesso tipo di tumore e lo stesso stadio di malattia, sottolineando l'importanza della variazione biologica interindividuale (73).

3.3 – Biopsia liquida

Con il termine biopsia liquida si fa riferimento all'utilizzo di fluidi biologici come alternativa al tessuto neoplastico per ottenere informazioni utili ai fini diagnostici, prognostici o per predire la risposta a terapie a bersaglio molecolare.

L'analisi del ct DNA isolato dal sangue periferico, rappresenta ad oggi la principale applicazione della biopsia liquida nella pratica clinica. Tuttavia, è possibile che nel futuro altri derivati ottenuti dal sangue, quali le cellule tumorali circolanti (CTCs), l'RNA tumorale circolante ed i microRNA (miRNA), come pure altri fluidi biologici, quali le urine ed il liquido cefalorachidiano, possano essere utilizzati nella pratica clinica (74).

Il DNA tumorale circolante può essere isolato sia dal plasma che dal siero. Alcuni studi hanno però dimostrato che il plasma rappresenta il gold standard in quanto nel siero è presente una quantità maggiore di DNA circolante non tumorale dovuto principalmente alla lisi dei globuli bianchi del sangue durante il processo di coagulazione (75).

Attualmente, le tecnologie di rilevamento del ctDNA includono principalmente il sistema di amplificazione delle mutazioni refrattarie (ARMS), la Real-Time PCR (Polymerase Chain Reaction), la Digital Droplets PCR e l'NGS (Next Generation Sequencing). Tutte queste metodiche sono in grado di eseguire analisi quantitative del ctDNA e un suo rilevamento qualitativo accurato attraverso l'amplificazione (76).

Grazie a tali tecnologie di rilevamento si è in grado di identificare le mutazioni driver derivanti dal tumore, fornendo le medesime informazioni genetiche ottenibili con la tradizionale biopsia tissutale (77). Di fatti, il ctDNA contiene alterazioni genetiche identiche a quelli del tumore primario, potendo guidare la scelta terapeutica mirata sul paziente.

Inoltre, la biopsia liquida presenti numerosi vantaggi rispetto alla classica biopsia tissutale (78):

- Comporta una minore invasività e riduzione dei costi (consistendo unicamente in un prelievo di sangue venoso);
- Non presenta rischi ed effetti avversi, al contrario della biopsia tradizionale;
- È facilmente ripetibile, e quindi facilita il rilevamento dei cambiamenti che intercorrono lungo il decorso della malattia;

- Consente di rilevare al meglio l'eterogeneità della neoplasia, in quanto i frammenti di ctDNA possono derivare da più siti tumorali all'interno dello stesso paziente;
- Semplifica il monitoraggio delle risposte terapeutiche.

D'altro canto, la biopsia liquida presenta diverse criticità che ne limita l'applicazione clinica. In primis, il ctDNA è rilasciato solo in piccole quantità e non tutti i pazienti presentano livelli rilevabili, soprattutto quelli con un basso carico tumorale. A causa della piccola quantità di materiale disperso in circolo, il sequenziamento può essere difficile e costoso.

Inoltre, non tutte le mutazioni rilevate sul cfDNA rilevabili sono correlate al cancro e quindi da riferire a ctDNA: infatti, il cfDNA può presentare mutazioni derivanti dall'emopoiesi clonale, soprattutto nei pazienti anziani, non correlate al tumore. In ultimo, la presenza in circolo di ctDNA è strettamente dipendente dallo stadio e dalle localizzazioni di malattia ma può anche essere ridotta dal trattamento.

3.4 – Applicazioni cliniche della biopsia liquida nel tumore al polmone

La prima applicazione reale della biopsia liquida alla pratica clinica oncologica ha riguardato proprio il cancro del polmone non a piccole cellule, ed in particolare la determinazione della presenza della mutazione del gene EGFR. Nel 2016, il ctDNA ha ricevuto l'approvazione della FDA degli Stati Uniti come primo test di biopsia liquida per l'identificazione di pazienti NSCLC con mutazioni EGFR, adatto per una terapia

mirata. Tramite le tecniche citate precedentemente (ddPCR, NGS) è, infatti, possibile quantificare il ctDNA in termini di copie/ml e individuare, se presenti, le mutazioni relative all'EGFR non wild type, coinvolti nella terapia del cancro del polmone (79). Tuttavia il gold standard diagnostico per la determinazione dello stato mutazionale del gene EGFR rimane il tessuto tumorale al momento della diagnosi o in fase di valutazione della terapia, mentre la biopsia liquida è attualmente raccomandata come possibile alternativa solo in casi selezionati. In particolare, viene utilizzata la biopsia liquida nei casi in cui la quantità e/o qualità del tessuto biotico disponibile non sia sufficiente per effettuare le analisi molecolari previste oppure nei casi in cui una biopsia o re-biopsia sia impossibile (80). Quest'ultimo caso riguarda soprattutto i pazienti con tumore EGFR-mutato che vanno incontro a progressione nonostante terapia di prima linea con inibitori tirosin-chinasici (TKI) di EGFR, di prima o seconda generazione. In tal caso, l'analisi del ctDNA è volta alla ricerca della mutazione di resistenza p.T790M nell'esone 20 del gene in questione, al fine di indirizzare ad un trattamento con TKI di terza generazione. (80 - 81).

L'innovazione della biopsia liquida nel tumore al polmone NSCLC ha portato i ricercatori a valutarne ulteriori possibili applicazioni, le quali al momento ancora non posso essere considerate standard ma che presumibilmente nel prossimo futuro rivoluzioneranno il management dei pazienti in campo oncologico. Un esempio di tali applicazioni emergenti è fornito dai numerosi studi che hanno dimostrato come la positività al ctDNA dopo resezione chirurgica sia correlata a esiti sfavorevoli per i pazienti con tumore al polmone (82 - 85). Nello studio di Qiu et al. (85), sono stati

esaminati 103 pazienti con NSCLC trattati con resezione chirurgica con o senza terapia adiuvante per valutare l'utilità del ctDNA nel monitoraggio della malattia e nella determinazione del trattamento. Da questo studio è emerso come la valutazione longitudinale post-trattamento del ctDNA può individuare i pazienti affetti da NSCLC a maggior rischio per recidiva di malattia, precedendo la recidiva diagnosticata radiologicamente di una mediana di 88 giorni.

4.5 – Ruolo del ctDNA nella diagnosi precoce di cancro del polmone

Attualmente, il ruolo del ctDNA come biomarker nel tumore polmonare NSCLC in stadio avanzato è ben delineato. Tuttavia, il suo ruolo nella diagnosi precoce del cancro al polmone è ancora incerto, mostrando dei possibili potenziali ma ancora moltissime criticità (86). Infatti, la quantità di ctDNA rilevato nel sangue dipende molto dallo stadio di malattia, con le frazioni di ctDNA che spesso presentano meno dello 0.1% della varianza di frequenze alleliche nel tumore del polmone allo stadio I (87). Questo dato rende la ricerca della frazione di ctDNA all'interno della totalità del cfDNA molto complessa, richiedendo sistemi di rilevamento molto sensibili.

Molteplici studi hanno riportato come il ctDNA presenti una sensibilità di circa il 48-59% negli stadi iniziali del tumore al polmone (88 - 90). Lo studio di Guo e colleghi ha applicato una ricerca mirata mediante un pannello da 50 geni in 30 pazienti con NSCLC al I e II stadio, riscontrando una buona concordanza con le mutazioni riscontrate su tessuto tumorale (80%) e un decremento dei livelli di ctDNA dopo trattamento chirurgico (90).

Lo studio di Shen et al. (91) ha esaminato la concentrazione mediana di cfDNA dei campioni di plasma preoperatori di pazienti con NSCLC in stadio I-III. Il valore mediano generale di cfDNA si attestava attorno agli 8,64 ng/ml, dimostrando però anche come allo stadio I tale valore risultava essere significativamente inferiore rispetto alle concentrazioni mediane negli stadi II e III (stadio I: 7,58 ng/ml, stadio II: 9,86 ng/ml, stadio III: 10,01 ng/ml). Inoltre, è stato evidenziato come non solo fattori strettamente correlati alla malattia neoplastica (quali lo stadio e l'istotipo tumorale) ma anche fattori individuali quali la giovane età e l'assenza di abitudine tabagica erano associati a concentrazioni di cfDNA significativamente inferiori.

Attualmente, l'utilizzo del ctDNA nei tumori polmonari in stadio precoce è fortemente limitato dalla bassa sensibilità degli strumenti diagnostici, dall'assenza di standardizzazione del processo e delle metodiche di rilevamento e di conseguenza riservata a studi sperimentali. Tuttavia, l'applicazione delle nuove metodiche più sensibili e specifiche, potrebbe aprire la strada per un suo utilizzo anche in fase diagnostica.

Sulla base delle nostre conoscenze, questo è il primo studio che cerca di analizzare il ruolo del ctDNA in fase diagnostica sul tumore polmonare in fase precoce, come quello rappresentato dalle GGO polmonari.

4. MATERIALI E METODI

Abbiamo condotto uno studio di tipo sperimentale, osservazionale e prospettico, approvato dal comitato etico del Policlinico Umberto I con protocollo Rif. 6681 del 06/04/24. La coorte di pazienti eleggibili per il nostro studio è composta da pazienti visitati presso il reparto di Chirurgia Toracica del Policlinico Umberto I per il riscontro radiologico accidentale di GGO di natura non determinata. Tutti i pazienti hanno sottoscritto un consenso informato con gli obiettivi dello studio al momento della visita. I pazienti sono stati arruolati secondo i seguenti criteri di inclusione:

- Età > 18 anni;
- Riscontro radiologico accidentale di opacità a vetro smerigliato (GGO);
- Paziente non in trattamento radio/chemioterapico per almeno 6 mesi;
- Paziente in grado di comprendere ed esprimere il proprio consenso allo studio.

Sono invece stati considerati criteri di esclusione:

- Presenza di tumori solidi od ematologici noti;
- Paziente in attuale trattamento radio-chemioterapico;
- Paziente che non esprime o non può esprimere il consenso per la partecipazione allo studio.

Ai pazienti arruolati sono stati prelevati, al momento della prima visita (T0), 20 mL di sangue venoso periferico conservati in provetta con acido etilendiamminotetraacetico (EDTA). Il successivo management del paziente è stato indipendente dallo studio e, in accordo con le attuali linee guida internazionali, ha compreso:

- Per le GGOs a basso-intermedio sospetto di malignità, un follow-up radiologico a 3-6 mesi, ripetibile nel tempo e che può durare fino a 2 anni;
- Per le GGOs ad alto sospetto di malignità, un riscontro istologico mediante agobiopsia polmonare transtoracica TC-guidata oppure, ove non effettuabile, biopsia chirurgica mediante escissione completa della lesione.

È stata considerata GGO benigna una lesione che mostrava caratteristiche radiologiche di miglioramento nel tempo oppure aspetti istologici non riferibili a neoplasia.

È stata considerata GGO maligna esclusivamente una lesione che, a seguito di campionamento bioptico o chirurgico, mostrava segni istologici riferibili a iperplasia adenomatosa atipica o patologia francamente neoplastica.

Il sangue del paziente, prelevato e conservato in EDTA, è stato trasportato presso il dipartimento di Anatomia Patologica (Laboratorio Biopsia Liquida) per la quantificazione del cfDNA e l'analisi del ctDNA. Il sangue intero raccolto è stato centrifugato a 2000 giri per 10 minuti ed il plasma raccolto dal campione nuovamente centrifugato per altri 10 minuti a 2000 giri per rimuovere eventuali detriti cellulari. Il sovranatante, di volume compreso tra i 4 e gli 8 mL, è stato quindi raccolto conservato a -80°C per la successiva analisi del DNA circolante.

Questa procedura di preparazione, raccolta e congelamento del plasma è stata condotta entro 2 ore dall'esecuzione del prelievo. Infatti, se il sangue viene immagazzinato per lunghi periodi, i globuli bianchi iniziano a lisare e rilasciare DNA genomico "wild type" nel campione. Ciò può falsare i risultati della quantificazione del cfDNA e soprattutto rende difficile la rilevazione di mutazioni o di altri biomarcatori di ctDNA.

Il cfDNA, comprendente sia il ctDNA sia una quota di DNA “wild type”, è stato estratto utilizzando Maxwell RSC Instrument, una metodica semi automatizzata che effettua concentrazione e purificazione degli acidi nucleici. Il DNA estratto è stato poi quantificato utilizzando Easy PGX (Diatech Pharmacogenetics, Jesi, AN, Italia), tecnologia basata sulla real time PCR (Polymerase Chain Reaction).

Per la ricerca del ctDNA è stato utilizzato un approccio di tipo mirato, ricercando le mutazioni più frequentemente associate al tumore del polmone mediante Miryapod® NGS Cancer Panel DNA, cod. NG033. Il kit permette la preparazione di librerie Next Generation Sequencing a partire da DNA genomico, purificato e non, isolato da tessuto tumorale (fresco, congelato, fissato in formalina incluso in paraffina) o plasma (cfDNA). I 17 geni inclusi nel pannello sono quelli le cui alterazioni sono implicate in numerosi tipi di tumore, tra cui il tumore del polmone. I geni analizzati sono stati: EGFR, KRAS, PIK3CA, FGFR3, MET, BRAF, ERBB2, ALK, IDH1, IDH2, HRAS, PDGFRA, NRAS, RET, ROS1, POL-E e KIT. I dati raccolti sono stati analizzati e la quantità di cfDNA e la rilevazione o meno del ctDNA nel sangue periferico dei pazienti sono stati correlati con la diagnosi radiologica/istologica delle GGOs per valutarne l’impatto nei pazienti con GGOs. Come successiva analisi, le mutazioni ritrovate nel sangue dei pazienti con positività al ctDNA, sono state messe a confronto, ove presenti, con le mutazioni presenti sul tessuto polmonare biotico o chirurgico. Per la stadiazione del tumore al polmonare è stata usata la 9th classificazione TMN secondo l’International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC).

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp). L'analisi univariata è stata eseguita utilizzando il test t di Student per i valori continui e distribuzione normale; il Mann-Whitney U test è stato utilizzato per valori continui e distribuzione non gaussiana. I dati con distribuzione discreta sono stati analizzati utilizzando il test di Fisher. La sperimentazione è stata condotta in ottemperanza al protocollo, alla GCP e alle disposizioni normative applicabili.

5. RISULTATI

Lo studio è stato diviso in una prima fase “pilota” seguita poi da un’ulteriore fase di arruolamento con i medesimi criteri di inclusione e dall’analisi definitiva del totale dei pazienti arruolati.

Per l’analisi preliminare di questo studio sono stati arruolati 10 pazienti che rispondevano ai criteri di inclusione ed esclusione. Le caratteristiche della coorte di pazienti coinvolta nel nostro studio sono riassunte nella Tabella 3.

I pazienti (5 uomini e 5 donne) avevano età compresa tra 48 e 84 anni, l’età media era di 68,1 $\pm$ 10,8 anni. Sei pazienti (60%) presentavano una diagnosi istologica di adenocarcinoma polmonare. Per tutti questi pazienti la diagnosi è stata ottenuta mediante intervento chirurgico di resezione polmonare. In particolare, 4 pazienti sono stati sottoposti a intervento chirurgico di lobectomia polmonare, un paziente a resezione polmonare atipica ed un paziente a segmentectomia del segmento 2R. Tra questi, 5 pazienti presentavano un tumore al I stadio (T1a 2 pazienti, T1b 3 pazienti) mentre un paziente ha avuto un nodulo satellite su un lobo differente rispetto al tumore primitivo (T4). Nessuno di questi pazienti ha presentato metastasi linfonodali. Quattro pazienti, a seguito di caratterizzazione istologica o secondo i criteri radiologici della Fleischner Society, hanno presentato una ground glass opacity di natura benigna. In particolare, due pazienti sono stati sottoposti a biopsia chirurgica con diagnosi istologica rispettivamente di polmonite lipoidea e danno interstiziale fumo-correlato, mentre due pazienti hanno presentato risoluzione o miglioramento della lesione GGO al follow-up radiologico.

<i>Pz</i>	<i>Età</i>	<i>Sesso</i>	<i>Tipo</i> <i>GGO</i>	<i>Diametro</i> <i>Max</i> <i>(mm)</i>	<i>Intervento</i>	<i>Istologia</i>	<i>PTNM</i>
1	68	F	Puro	20	Lobectomy	Polmonite lipoidea	-
2	74	M	Puro	18	Follow-up radiologico	-	-
3	80	F	Misto	18	Segmentectomy	Adenocarcinom a polmonare	T1bN0M0
4	55	F	Puro	8	Resezione atipica	Danno interstiziale fumo-correlato	-
5	48	M	Puro	10	Lobectomy	Adenocarcinom a polmonare	T1aN0M0
6	63	M	Misto	44	Lobectomy	Adenocarcinom a polmonare	T2aN0M0
7	69	F	Puro	13	Lobectomy	Adenocarcinom a polmonare	T1bN0M0
8	84	M	Misto	14	Resezione atipica	Adenocarcinom a polmonare	T1bN0M0
9	72	F	Misto	22	Lobectomy + resezione atipica	Adenocarcinom a polmonare	T4N0M0
10	68	M	Puro	17	Follow-up radiologico	-	-

Tabella 3. Caratteristiche della popolazione e delle lesioni GGOs esaminate

L'analisi delle caratteristiche radiologiche delle lesioni GGOs ha mostrato presenza di 6 GGO pure e 4 GGO miste, con un diametro medio di $19,4 \text{ mm} \pm 10,1 \text{ mm}$ (range 8 - 44 mm).

Le GGOs pure sono risultate essere più frequentemente benigne rispetto alle maligne (p value= 0.035). Non è stata trovata nessuna differenza statisticamente significativa tra grandezza della lesione e caratteristica radiologica della GGO (p value= 0.228) né tra grandezza della lesione e natura benigna/maligna della stessa (p value= 0.46).

Il cDNA è stato estratto su tutti e 10 i pazienti. La quantità media di DNA estratta dal plasma dei pazienti mediante Easy PGX è stata 1,23 ng/μl (range 0,23 – 5,9 ng/μl). L'analisi della quantità di cfDNA tra GGOs maligne e benigne ha rivelato che le GGOs maligne mostrano una media di DNA circolante significativamente inferiore rispetto alle GGOs benigne (0,613 vs 2,156 ng/μl; p value = 0.031).

I risultati dell'estrazione del ctDNA sono mostrati in Tabella 4.

Paziente	EasyPGX ng/ul	Indice Framm.	RISULTATI HIGH QUALITY	RISULTATI LOW QUALITY
1	0.2305	1.00	/	HRAS: c. 26_28delT GG p.9del ex2 1,36%; KIT: c. 1880-27 delT ex12 2,5%
2	0.5715	0.32	/	KIT: c.2050A>G p.Arg684Gly 1.27%(ex14; 1/14); IDH2: c.435dupG p.p.Thr146fs, 1.44 (ex4; 1/14); EGFR : c.c.299C>T p.Pro100Leu, 9.38% (ex3, 1/14) + c.2122A>G p.Lys708Glu, 7.41% (ex18, 1/14); PIK3CA: c.3077T>A p.Leu1026Gln 3.08% (ex21; 1/14).
3	1.2446	0.85	/	HRAS: c.3077T>A p.Leu1026Gln 3.08% (ex21; 1/14); KIT: c.2362T>C p.Cys788Arg 16.67% (ex17; 1/14); ALK: c.3611T>C p.Leu1204Pro 40% (ex23; 1/14).
4	1.2446	0.32	/	BRAF: c.1819T>C p.Ser607Pro 1.26% (ex15; 1/14)
5	0.3629	0.72	/	NRAS: c.4A>C p.Thr2Pro 77.78% (ex; 1/11); KIT: c.1901C>G p.Arg634Pro, 52.38% (ex14; 1/11); IDH2: c.435DELG p.Thr146fs 1.08% (ex4; 3/11)
6	0.4704	0.52	/	KIT: c.1496A>G p.Lys499Arg 1.01% (ex9; 4/11)
7	0.7407	0.43	/	/
8	0.7904	0.33	/	NRAS: c.128A>G p.Gln43Arg, 1.04% (ex3; 1/10); PIK3CA: c.962A>G p.Glu321Gly 1.09% (ex 5; 1/10); ERBB2: c.1985T>C p.Leu662Pro 2.82% (ex17; 1/10) + c.2027A>G p.Lys676Arg 1.68% (ex 17; 1/10)
9	0.7407	0.35	RET: c.2071G>A p.Gly691Ser 50.07% (ex11; 3/10)	NRAS: c.151T>C p.Cys51Arg 1.1% (ex3; 1/10); HRAS: c.26_28delTGG p.Val9del 1.15% (ex2; 4/10; ClinVar: Uncertain significance); ERBB2: c.1947-2A>G 1.77% (ex16; 1/10).
10	5.9030	0.48	RET: c.2071G>A p.Gly691Ser 51.18% (ex11; 3/10)	HRAS: c.-4A>G 1.2% (ex2; 1/10; 5_prime_UTR_variant).

Tabella 4. Risultati estrazione ctDNA mediante Easy PGX e mutazioni rilevate mediante Miryapod® NGS

Cancer Panel DNA, cod. NG033

Nove dei dieci pazienti hanno presentato dei risultati affidabili (sia in high quality che low quality) mentre per un paziente il campione di DNA circolante non è risultato idoneo per l'analisi del ctDNA.

Tra i 17 geni valutati quelli più frequentemente mutati sono risultati essere HRAS (4 pazienti, 40%) e KIT (4 pazienti, 40%), seguiti da NRAS (3 pazienti, 30%), IDH-2 (2 pazienti, 20%), RET (2 pazienti, 20%) e PIK3CA (2 pazienti, 20%).

L'analisi del DNA tumorale su tessuto è stata eseguita sui 6 pazienti con GGO maligna. È stata riscontrata la mutazione del gene EGFR in 3 pazienti (50%), mutazione di RET in 2 pazienti (33%), mutazione di KRAS in 1 paziente (17%) e mutazione BRAF in 1 paziente (17%). Un paziente (17%) non ha mostrato mutazioni nei geni esaminati.

L'analisi comparativa tra mutazioni presenti a livello del ctDNA e del tessuto ha mostrato concordanza solo per 2 pazienti con mutazione rispettivamente di EGFR e RET. Tuttavia, l'analisi genomica ha rivelato che il paziente con concordante mutazione di EGFR presentava su sangue la mutazione c.2050A>G p.Arg684Gly sull'esone 14, mentre sul tessuto tumorale presentava la mutazione c.2156G>C p.Gly719Ala sull'esone 18. Questi dati suggeriscono la non affidabilità del risultato sul ctDNA in quanto non concordante con la mutazione effettivamente riscontrata su tessuto. Infine, il paziente con concordante mutazione di RET (c.2071G>A p.Gly691Ser su esone 11) presentava una frequenza allelica molto alta (superiore al 50%) suggestivo dunque di un polimorfismo genetico più che di una mutazione legata all'adenocarcinoma polmonare.

In considerazione di questi risultati allo studio pilota, considerate le risorse limitate e i dati inconcludenti tra associazione di ctDNA e mutazioni a livello tissutale nei pazienti con GGO, l'analisi successiva si è focalizzata sullo studio della quantità di cfDNA come elemento discriminante tra GGO maligne e benigne.

Nella fase successiva dello studio sono stati arruolati ulteriori 17 pazienti per un totale campionario di 27 pazienti. Le caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti sono presentate in Tabella 5.

	n (± DS)	%
<i>Pazienti totali</i>	27	100%
<i>Età</i>		
<i>Media</i>	67,2 ± 11,7	
<i>Sesso</i>		
<i>M</i>	10	
<i>F</i>	17	
<i>Aspetto Radiologico</i>		
<i>Pure GGO</i>	13	
<i>Mixed GGO</i>	14	
<i>Diametro</i>		
<i>Media</i>	20,1 ± 10,7	
<i>Istologia</i>		
<i>ADC invasivo</i>	13	81,2
<i>MIA</i>	3	18,8
<i>Benigno</i>	11	40,7

Tabella 5. Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti. DS = deviazione standard; M = maschio; F = femmina; ADC = adenocarcinoma; MIA = minimally invasive adenocarcinoma

Di questi, 13 pazienti (48.1%) presentavano alla TC una GGO pura e 14 pazienti (51.9%) GGO miste, con un diametro medio complessivo di 21,1 mm (range 8 - 48 mm).

Sedici pazienti (59.3%) hanno presentato, a seguito dei criteri diagnostici descritti, una GGO maligna. In particolare, 3 (18.8 %) pazienti avevano un adenocarcinoma minimamente invasivo (MIA), 12 pazienti (75.0%) un adenocarcinoma invasivo al I stadio e 1 paziente (6.2%) un adenocarcinoma al III stadio per riscontro di una lesione satellite nello stesso lobo. Undici (40.7%) pazienti hanno invece avuto diagnosi di GGO benigna ed in particolare 5 pazienti (45.5%) hanno presentato una risoluzione del quadro dopo follow up radiologico e 6 pazienti (54.5%) diagnosi istologica di patologia infiammatoria dopo biopsia o escissione chirurgica.

Le GGOs miste sono risultate essere statisticamente più associate a patologie maligne rispetto alle GGOs pure (12/14, 85,7% vs 4/13 30,8%; p-value= 0.012). Non è stata trovata nessuna differenza statisticamente significativa tra natura maligna della GGO ed età (p-value 0,301), sesso (p-value 0,306), e diametro max della lesione (p-value 0,426).

Analizzando i dati relativi al cfDNA, la quantità media di DNA circolante estratto per singolo paziente è stata $1,37 \text{ ng}/\mu\text{L} \pm 0.59$. I pazienti con patologia maligna hanno confermato la tendenza ad avere in media una quantità minore di cfDNA nel sangue rispetto ai pazienti con patologia infiammatoria (1.19 ± 0.68 vs 1.41 ± 1.57). Tuttavia, l'analisi delle

medie ha rivelato che questa differenza non è statisticamente significativa (p-value 0.711) (Figura 2).

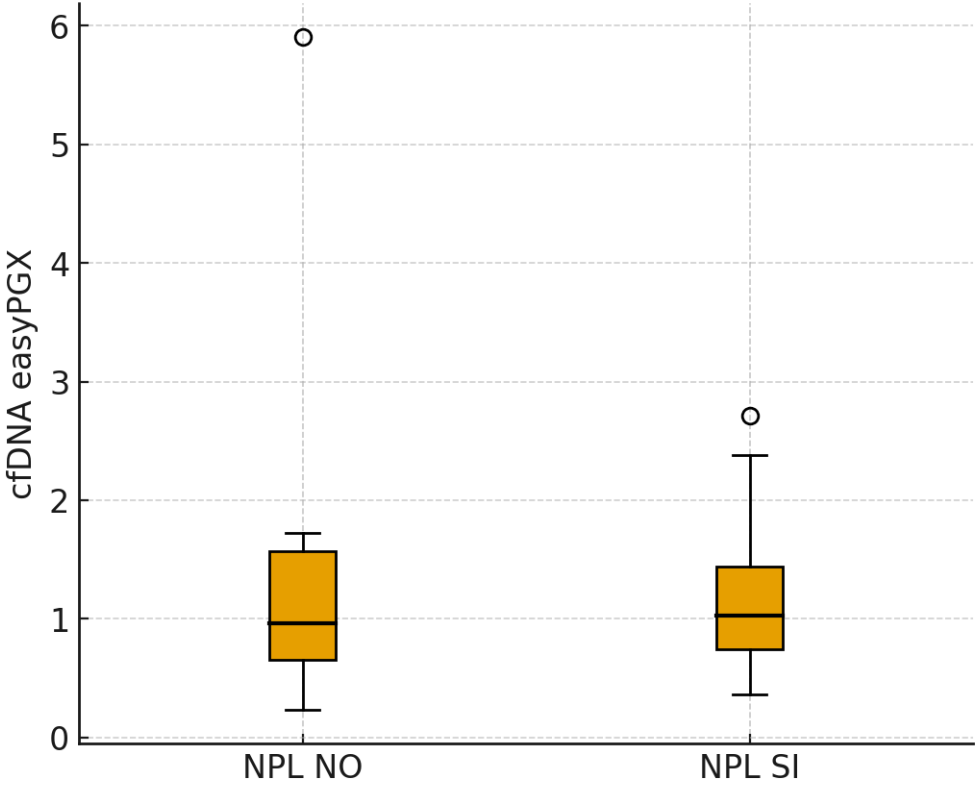


Figura 2. Boxplot comparativo per cfDNA quantificato tramite easyPGX nei due gruppi. NPL = neoplasia

6. DISCUSSIONE

L'obiettivo principale del nostro studio è stato quello di valutare il ruolo del DNA circolante tumorale come biomarker di malignità nei pazienti con GGO, con lo scopo di consentire una diagnosi precoce e con tecniche non invasive del cancro del polmone.

Nonostante l'esiguità del campione, dovuta alla natura preliminare del nostro studio, non permetta di dare dei risultati definitivi, il ctDNA non sembra avere un ruolo diagnostico negli stadi precoci della neoplasia polmonare.

Infatti, sebbene in ben il 90% dei pazienti sia stata detectata una quota di ctDNA su sangue, questi hanno presentato delle mutazioni non concordi con quelle valutate su biopsia tissutale, ad eccezione di un paziente con mutazione di RET. Nonostante in una piccola percentuale (1-2%) degli adenocarcinomi polmonari sia descritto il riarrangiamento di RET, precisamente la fusione con geni quali KIF5B e CCDC6, il significato clinico della mutazione puntiforme di RET identificata nel nostro studio, rimane ancora sconosciuto. Inoltre, nel nostro caso, tale variante era presente con una frequenza allelica molto alta (<50%) e pertanto da riferire in prima ipotesi a un polimorfismo.

È da considerare che questi dati comprendono anche risultati low-quality ottenuti dall'analisi del ctDNA, che dopo valutazione clinica non sono stati scartati in quanto il macchinario di rilevamento utilizzato (Miryapod® NGS Cancer Panel DNA, cod. NG033) non è ancora adeguatamente validato su biopsia liquida. Questi risultati, corroborati dal fatto che quasi la totalità dei pazienti con diagnosi di GGO maligna presenta un tumore ad uno stadio precoce e a volte pre-invasivo, ci suggeriscono che in questa fase della malattia

il tumore non riversi quote significative e quindi rilevabili di DNA tumorale nel torrente circolatorio.

In considerazione di questi dati, e considerati gli alti costi di analisi dei pannelli per l'identificazione del ctDNA su sangue e su tessuto (circa 800 euro/paziente), al termine dello studio preliminare "pilota" abbiamo deciso di soprassedere all'ulteriore ricerca di ctDNA su plasma e tessuto dei successivi pazienti.

Per quanto riguarda l'analisi del cfDNA, invece, a seguito dello studio pilota, è risultata una lieve tendenza dei pazienti con patologia benigna ad esprimere più alti livelli di cfDNA rispetto ai pazienti con GGO maligna. Questa tendenza, confermata anche dopo la fine della seconda fase di arruolamento, non risulta essere statisticamente significativa nel nostro campione. Tuttavia, se analizziamo esclusivamente i pazienti con diagnosi di patologia infiammatoria acuta, hanno presentato valori medi di cDNA pari a 2,32 ng/μl rispetto ai pazienti in cui la GGO è stata ricondotta ad adenocarcinoma polmonare, i quali hanno mostrato valori medi di 1,19 ng/μl. Questi dati possono essere spiegati dal fatto che la presenza di condizioni infiammatorie, come infezioni o altre patologie polmonari, si associano a un aumento dei livelli di cfDNA, come riportato in letteratura (92).

Il nostro studio presenta diversi limiti. In primis il campione è relativamente piccolo dovuto principalmente agli alti costi di analisi per singolo paziente. Lo studio, se pur prospettico, è uno studio monocentrico, con possibile bias di selezione dovuto al fatto che i pazienti sono tutti pazienti riferiti alla chirurgia toracica. Per finire, come già menzionato, il pannello per la rilevazione del ct DNA non è ancora stato validato per biopsia liquida e quindi abbiamo dovuto comprendere nella nostra analisi anche risultati definiti "low quality".

7. CONCLUSIONI

Dal nostro studio emerge come il tumore del polmone a uno stadio precoce che si manifesta radiologicamente come GGO rilasci nel sangue scarse quantità di ctDNA. Questo dato è avvalorato dal fatto che, anche se rilevate quote di ctDNA nel sangue utilizzando la nostra metodica, queste mutazioni non siano poi state rilevate nel tessuto tumorale. Tuttavia, il nostro campione di pazienti con GGO infiammatoria ha presentato in media quantità di DNA circolante libero maggiori rispetto ai pazienti con patologia maligna, anche se l'esiguità del campione non permette di avere risultati attendibili. Questo dato potrebbe aprire nuovi filoni di ricerca per l'utilizzo del cfDNA nella diagnosi differenziale delle GGO. Anche se allo stato attuale il ctDNA non sembra avere un ruolo nella diagnosi precoce di tumore al polmone nei pazienti con GGOs, l'avanzamento delle tecniche diagnostiche non esclude in futuro un possibile ruolo del ctDNA quale marker diagnostico in questi di pazienti.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Hansell DM, Bankier AA, MacMahon H, McCloud TC, Müller NL, Remy J. Fleischner Society: glossary of terms for thoracic imaging. *Radiology*. 2008 Mar;246(3):697-722. doi: 10.1148/radiol.2462070712. Epub 2008 Jan 14. PMID: 18195376.
2. Pedersen JH, Saghir Z, Wille MM, et al. Ground- Glass Opacity Lung Nodules in the Era of Lung Cancer CT Screening: Radiology, Pathology, and Clinical Management. *Oncology (Williston Park)* 2016;30:266-74.
3. Lee SW, Leem CS, Kim TJ, Lee KW, Chung JH, Jheon S, Lee JH, Lee CT. The long-term course of ground-glass opacities detected on thin- section computed tomography. *Respir Med*. 2013 Jun;107(6):904-10. doi: 10.1016/j.rmed.2013.02.014. Epub 2013 Mar 17. PMID: 23514949.
4. 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;365:395-409.
5. Lee CT. What do we know about ground- glass opacity nodules in the lung? *Transl Lung Cancer Res* 2015;4(5):656-659. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2015.04.05
6. Fu F, Zhang Y, Wen Z et al. Distinct prognostic factors in patients with stage i non-small cell lung cancer with radiologic part-solid or solid lesions. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2019;14(12):2133-2142.
7. Ye T, Deng L, Wang S et al. Lung adenocarcinomas manifesting as radiological part-solid nodules define a special clinical subtype. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2019;14(4):617-627.
8. Li, X., Ren, F., Wang, S., He, Z., Song, Z., Chen, J., & Xu, S. (2020). The Epidemiology of Ground Glass Opacity Lung Adenocarcinoma: A Network-Based Cumulative Meta-Analysis. *Frontiers in oncology*, 10, 1059. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01059>

9. Henschke CI, Yankelevitz DF, Mirtcheva R, McGuinness G, McCauley D, Miettinen OS; ELCAP Group. CT screening for lung cancer: frequency and significance of part-solid and nonsolid nodules. *AJR Am J Roentgenol*. 2002 May;178(5):1053-7. doi: 10.2214/ajr.178.5.1781053. PMID: 11959700.
10. Suzuki K, Kusumoto M, Watanabe S, Tsuchiya R, Asamura H. Radiologic classification of small adenocarcinoma of the lung: Radiologic-pathologic correlation and its prognostic impact. *Ann Thorac Surg* 2006;81(2):413-419.
11. MacMahon, H., Naidich, D. P., Goo, J. M., Lee, K. S., Leung, A. N. C., Mayo, J. R., Mehta, A. C., Ohno, Y., Powell, C. A., Prokop, M., Rubin, G. D., Schaefer-Prokop, C. M., Travis, W. D., Van Schil, P. E., & Bankier, A. A. (2017). Guidelines for Management of Incidental Pulmonary Nodules Detected on CT Images: From the Fleischner Society 2017. *Radiology*, 284(1), 228–243. doi: 10.1148/radiol.12120628. Epub 2012 Oct 15. PMID: 23070270.
12. Xi, J., Yin, J., Liang, J., Zhan, C., Jiang, W., Lin, Z., Xu, S., & Wang, Q. (2021). Prognostic Impact of Radiological Consolidation Tumor Ratio in Clinical Stage IA Pulmonary Ground Glass Opacities. *Frontiers in oncology*, 11, 616149. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.616149>
13. Zhao, L., Dong, H., Chen, Y., Wu, F., Han, C., Kuang, P., Guan, X., & Xu, X. (2025). Preoperative Prognosis Prediction for Pathological Stage IA Lung Adenocarcinoma: 3D-Based Consolidation Tumor Ratio is Superior to 2D-Based Consolidation Tumor Ratio. *Academic radiology*, 32(9), 5567–5575. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2025.05.040>
14. Hewitt MG, Miller WT, Reilly TJ, Simpson S. The relative frequencies of causes of widespread ground-glass opacity: a retrospective cohort. *Eur J Radiol*. 2014;83:1970–6.
15. Park, C. M., Goo, J. M., Lee, H. J., Lee, C. H., Chun, E. J., & Im, J. G. (2007). Nodular ground-glass opacity at thin-section CT: histologic correlation and evaluation of change at follow-up. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*, 27(2), 391–408. <https://doi.org/10.1148/rg.272065061>

16. Collins J, Stern EJ. Ground glass opacity at CT: the ABCs. *AJR* 1997;169:355-67.
17. Cozzi D, Cavigli E, Moroni C, Smorchkova O, Zantonelli G, Pradella S, Miele V. Ground-glass opacity (GGO): a review of the differential diagnosis in the era of COVID-19. *Jpn J Radiol.* 2021 Aug;39(8):721-732. doi: 10.1007/s11604-021-01120-w. Epub 2021 Apr 26. PMID: 33900542; PMCID: PMC8071755.
18. Gandara DR, Aberle D, Lau D, et al. Radiographic imaging of bronchioloalveolar carcinoma: screening, patterns of presentation and response assessment. *J Thorac Oncol* 2006; 1: Suppl. 9, S20–S26.
19. Zhang Y, Fu F, Chen H. Management of Ground-Glass Opacities in the Lung Cancer Spectrum. *Ann Thorac Surg.* 2020 Dec;110(6):1796-1804. doi: 10.1016/j.athoracsur.2020.04.094. Epub 2020 Jun 7. PMID: 32525031.
20. Oikonomou, A., & Prassopoulos, P. (2013). Mimics in chest disease: interstitial opacities. *Insights into imaging*, 4(1), 9–27. <https://doi.org/10.1007/s13244-012-0207-7>
21. Oikonomou A, Müller NL, Nantel S. Radiographic and high-resolution CT findings of influenza virus pneumonia in patients with hematologic malignancies. *Am J Roentgenol.* 2003;181(2):507–11.
22. Ajlan AM, Quiney B, Nicolaou S, Müller NL. Swine-origin influenza A (H1N1) viral infection: radiographic and CT findings. *Am J Roentgenol.* 2009;193(6):1494–9.
23. Storto ML, Kee ST, Golden JA, Webb WR. Hydrostatic pulmonary edema: high resolution CT findings. *Am J Roentgenol.* 1995;165(5):817–20.
24. Huie TJ, Olson AL, Cosgrove GP, et al. A detailed evaluation of acute respiratory decline in patients with fibrotic lung disease: aetiology and outcomes. *Respirology.* 2010;15:909–17.
25. Zare Mehrjardi M, Kahkouee S, Pourabdollah M. Radio-pathological correlations of organizing pneumonia (OP): a pictorial review. *Br J Radiol.* 2017;90(1071):20160723.
26. Kushihashi T, Munechika H, Ri K, et al. Bronchioloalveolar adenoma of the lung: CT-pathologic correlation. *Radiology* 1994; 193: 789–793.

27. Jang HJ, Lee KS, Kwon OJ, Rhee CH, Shim YM, Han J. Bronchioloalveolar carcinoma: focal area of ground-glass attenuation at thin-section CT as an early sign. *Radiology* 1996; 199: 485–488.
28. Nakata M, Saeki H, Takata I, et al. Focal ground-glass opacity detected by low-dose helical CT. *Chest* 2002; 121: 1464–1467.
29. Kakinuma R, Ohmatsu H, Kaneko M, et al. Progression of focal pure ground-glass opacity detected by low-dose helical computed tomography screening for lung cancer. *J Comput Assist Tomogr* 2004; 28: 17–23.
30. Takashima S, Maruyama Y, Hasegawa M, et al. CT findings and progression of small peripheral lung neoplasms having a replacement growth pattern. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 180: 817–826.
31. Infante M, Lutman RF, Imparato S, Di Rocco M, Ceresoli GL, Torri V, Morengi E, Minuti F, Cavuto S, Bottoni E, Inzirillo F, Cariboni U, Errico V, Incarbone MA, Ferraroli G, Brambilla G, Alloisio M, Ravasi G. Differential diagnosis and management of focal ground-glass opacities. *Eur Respir J*. 2009 Apr;33(4):821-7. doi: 10.1183/09031936.00047908. Epub 2008 Dec. PMID: 19047318
32. Wang C, Wu Y, Li J, Ren P, Gou Y, Shao J, Zhou Y, Xiao X, Tuersun P, Liu D, Zhang L, Li W. Distinct clinicopathologic factors and prognosis based on the presence of ground-glass opacity components in patients with resected stage I non-small cell lung cancer. *Ann Transl Med*. 2020 Sep;8(18):1133. doi: 10.21037/atm-20-4971. PMID: 33240982; PMCID: PMC7576059.
33. Oh JY, Kwon SY, Yoon HI, Lee SM, Yim JJ, Lee JH, Yoo CG, Kim YW, Han SK, Shim YS, Kim TJ, Lee KW, Chung JH, Jheon SH, Sung SW, Lee CT. Clinical significance of a solitary ground-glass opacity (GGO) lesion of the lung detected by chest CT. *Lung Cancer*. 2007 Jan;55(1):67-73. doi: 10.1016/j.lungcan.2006.09.009. Epub 2006 Nov 7. PMID: 17092604.
34. McWilliams A, Tammemagi MC, Mayo JR, Roberts H, Liu G, Soghrati K, Yasufuku K, Martel S, Laberge F, Gingras M, Atkar-Khattra S, Berg CD, Evans K, Finley R, Yee J, English J, Nasute P, Goffin J, Puksa S, Stewart L, Tsai S, Johnston MR, Manos D,

- Nicholas G, Goss GD, Seely JM, Amjadi K, Tremblay A, Burrowes P, MacEachern P, Bhatia R, Tsao MS, Lam S. Probability of cancer in pulmonary nodules detected on first screening CT. *N Engl J Med*. 2013 Sep 5;369(10):910-9. doi: 10.1056/NEJMoa1214726. PMID: 24004118; PMCID: PMC3951177.
35. Lee HJ, Goo JM, Lee CH, et al. Predictive CT findings of malignancy in ground- glass nodules on thin-section chest CT: the effects on radiologist performance. *Eur Radiol* 2009; 19:552–560.
 36. Takahashi S, Tanaka N, Okimoto T, et al. Long term follow-up for small pure ground- glass nodules: implications of de- termining an optimum follow-up period and high- resolution CT findings to pre- dict the growth of nodules. *Jpn J Radiol* 2012; 30:206–217.
 37. Henschke CI, Yankelevitz DF, Mirtcheva R, McGuinness G, McCauley D, Miettinen OS. Ct screening for lung cancer: Frequency and significance of part-solid and nonsolid nodules. *American Journal of Roentgenology* 2002;178(5):1053-1057.
 38. Wang, W., Yang, B., Wu, H., Che, H., Tong, Y., Zhang, B., Liu, H., & Chen, Y. (2025). Auxiliary Diagnosis of Pulmonary Nodules' Benignancy and Malignancy Based on Machine Learning: A Retrospective Study. *Journal of multidisciplinary healthcare*, 18, 3735–3748. <https://doi.org/10.2147/JMDH.S518166>
 39. Zhao, Y., Ye, Z., Yan, Q., Sun, H., & Zhao, F. (2024). Predicting the invasiveness of ground-glass opacity predominant lung adenocarcinoma with clinical stage Ia: a CT-based semantic and radiomics analysis. *Journal of thoracic disease*, 16(10), 6713–6726. <https://doi.org/10.21037/jtd-24-775>
 40. Bin, J., Wu, M., Huang, M., Liao, Y., Yang, Y., Shi, X., & Tao, S. (2024). Predicting invasion in early-stage ground-glass opacity pulmonary adenocarcinoma: a radiomics-based machine learning approach. *BMC medical imaging*, 24(1), 240. <https://doi.org/10.1186/s12880-024-01421-2>
 41. Baldwin DR, Callister ME; Guideline Development Group. The British Thoracic Society guidelines on the investigation and management of pulmonary nodules.

- Thorax. 2015 Aug;70(8):794-8. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-207221. Epub 2015 Jul 1. PMID: 26135833.
42. Chang B, Hwang JH, Choi YH, et al. Natural history of pure ground-glass opacity lung nodules detected by low-dose CT scan. *Chest*. 2013;143:172- 8.
 43. Casiraghi, M., Girelli, L., Elettore, A., Bertolaccini, L., Mazzella, A., Bardoni, C., Lombardi, M., Midolo, V., Petralia, G., Maisonneuve, P., Guarize, J., & Spaggiari, L. (2025). Clinicopathological Features and Prognosis of Lung Adenocarcinoma Presenting as Ground-Glass Opacity: A Single-Center Experience. *Cancers*, 17(18), 3016. <https://doi.org/10.3390/cancers17183016>
 44. Ishida, H., Shimizu, Y., Umesaki, T., Nitanda, H., Taguchi, R., Ichiki, Y., Kagamu, H., & Yasuda, M. (2025). Prognostic significance of lepidic component in invasive non-mucinous adenocarcinoma of the lung. *Cancer treatment and research communications*, 45, 100990. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2025.100990>
 45. Xu, Y., Wang, Z., Tao, Y., Zhang, J., Migliore, M., Matsumoto, Y., Fra-Fernández, S., Zhou, Q., & Luo, Q. (2025). Ground-Glass Opacity Component as a Protective Factor for Patients With Invasive Adenocarcinoma ≤ 3 cm With Micropapillary or Solid Pathological Patterns. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 67(9), ezaf285. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezaf285>
 46. Nakata M, Sawada S, Yamashita M, Saeki H, Kurita A, Takashima S, Tanemoto K. Objective radiologic analysis of ground-glass opacity aimed at curative limited resection for small peripheral non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005 Jun;129(6):1226-31. doi: 10.1016/j.jtcvs.2004.10.032. PMID: 15942561.
 47. Hattori, A., Suzuki, K., Takamochi, K., Wakabayashi, M., Sekino, Y., Tsutani, Y., Nakajima, R., Aokage, K., Saji, H., Tsuboi, M., Okada, M., Asamura, H., Nakamura, K., Fukuda, H., Watanabe, S. I., Japan Clinical Oncology Group, & West Japan Oncology Group (2024). Segmentectomy versus lobectomy in small-sized peripheral non-small-cell lung cancer with radiologically pure-solid appearance in Japan

- (JCOG0802/WJOG4607L): a post-hoc supplemental analysis of a multicentre, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Respiratory medicine*, 12(2), 105–116. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(23\)00382-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(23)00382-X)
48. Altorki, N. K., Wang, X., Wigle, D., Gu, L., Darling, G., Ashrafi, A. S., Landrenau, R., Miller, D., Liberman, M., Jones, D. R., Keenan, R., Conti, M., Wright, G., Veit, L. J., Ramalingam, S. S., Kamel, M., Pass, H. I., Mitchell, J. D., Stinchcombe, T., Vokes, E., ... Kohman, L. J. (2018). Perioperative mortality and morbidity after sublobar versus lobar resection for early-stage non-small-cell lung cancer: post-hoc analysis of an international, randomised, phase 3 trial (CALGB/Alliance 140503). *The Lancet. Respiratory medicine*, 6(12), 915–924. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30411-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30411-9)
 49. Nccn clinical practice guidelines in oncology: Non-small cell lung cancer (version 2. 2020). Available at https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf.
 50. Mandel P, Métais P (1948) Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales* 142:241–243
 51. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG (1966) Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Clinical Investigation* 45(11):1732–1740. doi:10.1172/JCI105479
 52. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Research* 37(3):646–650
 53. Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM and Sorenson GC (1998) Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas* 17: 89-97
 54. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD and Knippers R (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 61,1659–65.
 55. Chiu, R.W., Chan, K.C., Gao, Y., Lau, V.Y., Zheng, W., Leung, T.Y., Foo, C.H., Xie, B., Tsui, N.B., Lun, F.M., Zee, B.C., Lau, T.K., Cantor, C.R., Lo, Y.M., 2008. Noninvasive pre- natal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic se- quencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20458–20463.

56. Chang, C.P., Chia, R.H., Wu, T.L., Tsao, K.C., Sun, C.F., Wu, J.T., 2003. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 327, 95–101.
57. Rainer, T.H., Wong, L.K., Lam, W., Yuen, E., Lam, N.Y., Metreweli, C., Lo, Y.M., 2003. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem* 49, 562–569.
58. Yu, S.C.Y., Lee, S.W.Y., Jiang, P., Leung, T.Y., Chan, K.C.A., Chiu, R.W.K., Lo, Y.M.D., Redman, C.W., 2013. High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clin. Chem.* 59, 1228–1237. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.203679>.
59. Fleischhacker, M., Schmidt, B., 2007. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochim Biophys Acta* 1775, 181–232.
60. Stawski, R., Walczak, K., Kosielski, P., Meissner, P., Budlewski, T., Padula, G., Nowak, D., 2017. Repeated bouts of exhaustive exercise increase circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA without development of tolerance in healthy men. *PLoS One* 12, e0178216.
61. Fatouros, I.G., Jamurtas, A.Z., Nikolaidis, M.G., Destouni, A., Michailidis, Y., Vrettou, C., Douroudos, I.I., Avloniti, A., Chatzinikolaou, A., Taxildaris, K., Kanavakis, E., Papassotiriou, I., Kouretas, D., 2010. Time of sampling is crucial for measurement of cell-free plasma DNA following acute aseptic inflammation induced by exercise. *Clin Biochem* 43, 1368–1370.
62. Diehl, F., Li, M., Dressman, D., He, Y., Shen, D., Szabo, S., Diaz, L.A., Goodman, S.N., David, K.A., Juhl, H., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 2005. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16368–16373.
63. Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., Dunlop, D., 1984. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142, 67–77.

64. Dennin, R.H., 1979. DNA of free and complexed origin in human plasma: Concentration and length distribution. *J. Mol. Med.* 57, 451–456. <https://doi.org/10.1007/BF01477498>.
65. Fujisawa R, Iwaya T, Endo F, Idogawa M, Sasaki N, Hiraki H, et al. Early dynamics of circulating tumor DNA predict chemotherapy responses for patients with esophageal cancer. *Carcinogenesis*. 2021;42(10):1239–49.
66. Swarup, V., Rajeswari, M.R., 2007. Circulating (cell-free) nucleic acids—a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett* 581, 795–799.
67. Schwarzenbach, H., Hoon, D.S., Pantel, K., 2011. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 11, 426–437.
68. Alix-Panabières, C., Schwarzenbach, H., Pantel, K., 2012. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med* 63, 199–215.
69. Vagner T, Spinelli C, Minciacchi VR, Balaj L, Zandian M, Conley A, Zijlstra A, Freeman MR, Demichelis F, De S, et al. Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1505403.doi:10.1080/20013078.2018.1505403.
70. Arisi, M. F., Dotan, E., & Fernandez, S. V. (2022). Circulating Tumor DNA in Precision Oncology and Its Applications in Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences*, 23(8), 4441. <https://doi.org/10.3390/ijms23084441>
71. Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, R.J., et al. L.A., 2014. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 6, 224ra24.
72. García-Olmo, D.C., Domínguez, C., García-Arranz, M., Anker, P., Stroun, M., García-Verdugo, J.M., García-Olmo, D., 2010. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res* 70, 560–567.
73. Snyder, M.W., Kircher, M., Hill, A.J., Daza, R.M., Shendure, J., 2016. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell* 164, 57–68.

74. Linee guida Associazione Italiana Oncologia Medica (AIOM).
https://www.aiom.it/wpcontent/uploads/2020/07/2020_Raccomandazioni_Biopsia_Liquida.pdf
75. Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev*, 2002.
76. Li W, Liu JB, Hou LK, Yu F, Zhang J, Wu W, Tang XM, Sun F, Lu HM, Deng J, Bai J, Li J, Wu CY, Lin QL, Lv ZW, Wang GR, Jiang GX, Ma YS, Fu D. Liquid biopsy in lung cancer: significance in diagnostics, prediction, and treatment monitoring. *Mol Cancer*. 2022 Jan 20;21(1):25. doi: 10.1186/s12943-022-01505-z. PMID: 35057806; PMCID: PMC8772097.
77. Russo A, Giordano A, Rolfo C, et al. Liquid biopsy in cancer patients: the hand lens to investigate tumor evolution. *Current Clinical Pathology*. Springer International Publishing 2017.
78. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol*. 2022 Sep 12;15(1):131. doi: 10.1186/s13045-022-01351-y. PMID: 36096847; PMCID: PMC9465933.
79. Rijavec E, Coco S, Genova C, Rossi G, Longo L, Grossi F. Liquid Biopsy in Non-Small Cell Lung Cancer: Highlights and Challenges. *Cancers (Basel)*. 2019 Dec 19;12(1):17. doi: 10.3390/cancers12010017. PMID: 31861557; PMCID: PMC7017364.
80. Linee Guida «Neoplasie del polmone» AIOM (Associazione Italiana Oncologia Medica) Edizione 2021 https://snlg.iss.it/wp-content/uploads/2021/11/LG149_Polmone_agg2021.pdf
81. Del Re M, Crucitta S, Gianfilippo G, Passaro A, Petrini I, Restante G, Michelucci A, Fogli S, de Marinis F, Porta C, Chella A, Danesi R. Understanding the Mechanisms of Resistance in EGFR-Positive NSCLC: From Tissue to Liquid Biopsy to Guide Treatment Strategy. *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 14;20(16):3951. doi: 10.3390/ijms20163951. PMID: 31416192; PMCID: PMC6720634.(2019).
82. Chaudhuri, A. A. et al. Early detection of molecular residual disease in localized lung cancer by circulating tumor DNA profiling. *Cancer Disco*. 7, 1394–1403 (2017).

83. Abbosh, C. et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature* 545, 446–451 (2017).
84. Newman, A. M. et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat. Med.* 20, 548–554 (2014).
85. Qiu B, Guo W, Zhang F, Lv F, Ji Y, Peng Y, Chen X, Bao H, Xu Y, Shao Y, Tan F, Xue Q, Gao S, He J. Dynamic recurrence risk and adjuvant chemotherapy benefit prediction by ctDNA in resected NSCLC. *Nat Commun.* 2021 Nov 19;12(1):6770. doi: 10.1038/s41467-021-27022-z. PMID: 34799585; PMCID: PMC8605017.
86. Sassorossi, C., Evangelista, J., Stefani, A., Chiappetta, M., Martino, A., Campanella, A., De Paolis, E., Nachira, D., Del Re, M., Guerrera, F., Boldrini, L., Urbani, A., Margaritora, S., Minucci, A., Bria, E., & Lococo, F. (2025). The Role of ctDNA for Diagnosis and Histological Prediction in Early Stage Non-Small-Cell Lung Cancer: A Narrative Review. *Diagnostics* (Basel, Switzerland), 15(7), 904. <https://doi.org/10.3390/diagnostics15070904>
87. Jiang, J., Adams, H. P., Yao, L., Yaung, S., Lal, P., Balasubramanyam, A., Fuhlbrück, F., Tikoo, N., Lovejoy, A. F., Froehler, S., Fang, L. T., Achenbach, H. J., Floegel, R., Krügel, R., & Palma, J. F. (2020). Concordance of Genomic Alterations by Next-Generation Sequencing in Tumor Tissue versus Cell-Free DNA in Stage I-IV Non-Small Cell Lung Cancer. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 22(2), 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.10.013>
88. Abbosh C, Birkbak NJ, Swanton C. Early stage NSCLC - challenges to implementing ctDNA-based screening and MRD detection. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(9):577–86
89. Cohen JD, Li L, Wang Y, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* (80-). 2018;359(6378):926–930.
90. Guo, N., Lou, F., Ma, Y., Li, J., Yang, B., Chen, W., Ye, H., Zhang, J. B., Zhao, M. Y., Wu, W. J., Shi, R., Jones, L., Chen, K. S., Huang, X. F., Chen, S. Y., & Liu, Y. (2016). Circulating tumor DNA detection in lung cancer patients before and after surgery. *Scientific reports*, 6, 33519. <https://doi.org/10.1038/srep33519>

91. Shen H, Jin Y, Zhao H, Wu M, Zhang K, Wei Z, Wang X, Wang Z, Li Y, Yang F, Wang J, Chen K. Potential clinical utility of liquid biopsy in early-stage non-small cell lung cancer. *BMC Med.* 2022 Dec 14;20(1):480. doi: 10.1186/s12916-022-02681-x. PMID: 36514063; PMCID: PMC9749360.
92. Zwirner, K., Hilke, F. J., Demidov, G., Ossowski, S., Gani, C., Rieß, O., Zips, D., Welz, S., & Schroeder, C. (2018). Circulating cell-free DNA: A potential biomarker to differentiate inflammation and infection during radiochemotherapy. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 129(3), 575–581. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2018.07.016>