

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Scuola di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Applicata e Sperimentale

Curriculum Biosanitario



***Nuovi Fattori Prognostici e Predittivi nel
Carcinoma non a Piccole Cellule del
Polmone - NSCLC: marcatori e tecniche
diagnostiche***

Relatori

Prof.ssa Anna Lisa Furfaro

Dott.ssa Maria Angela Ferro

Candidato

Margherita Brancato

Correlatore

Prof.ssa Mariapaola Nitti

Anno Accademico

2021-2022

*A Giovanni,
collega, paziente
... mio papà.*

INTRODUZIONE

1. IL TUMORE AL POLMONE

1.1 Incidenza

1.2 Mortalità e sopravvivenza

2. FATTORI DI RISCHIO

3. PATOGENESI

4. ITER DIAGNOSTICO

5. DIAGNOSI MICROSCOPICA

5.1 Classificazione istologica dei tumori polmonari maligni

5.2 Il ruolo dell'immunoistochimica (IHC)

6. LA BIOLOGIA MOLECOLARE NEL TUMORE AL POLMONE

6.1 Fattori prognostici e predittivi

6.2 Bersagli molecolari negli Adenocarcinomi: mutazioni, traslocazioni e iperespressioni

7. TRATTAMENTO e TERAPIA

8. BIOPSIA LIQUIDA

9. SCOPO DEL LAVORO

10. MATERIALI E METODI

10.1 Selezione dei casi

10.2 Metodiche per la rilevazione dei target molecolari

11. RISULTATI

12. DISCUSSIONE

13. CONCLUSIONI

14. BIBLIOGRAFIA

15. RINGRAZIAMENTI

INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni, i laboratori di Anatomia Patologica hanno subito una profonda trasformazione ed innovazione tecnologica, che ha permesso l'adeguamento per la ricerca di tutti quei nuovi marcatori, ad oggi fondamentali nell'iter diagnostico e terapeutico delle patologie oncologiche.

La ricerca e l'individuazione di nuovi biomarcatori e la loro applicazione hanno permesso di caratterizzare al meglio le neoplasie dal punto di vista dell'aggressività e, al tempo stesso, di individuare nuovi possibili bersagli terapeutici.

Tutto questo è frutto di un grande lavoro di equipe: ricercatori, biologi, farmacologi, internisti, radiologi, chirurghi, anatomo-patologi e oncologi, un grande lavoro di squadra, mirato a migliorare le condizioni e le prospettive di vita dei malati oncologici.

Grande attenzione è stata rivolta al tumore al polmone che costituisce una delle neoplasie più frequentemente diagnosticate nel Mondo Occidentale.

Negli ultimi decenni, lo studio delle alterazioni molecolari riscontrabili nei carcinomi del polmone non a piccole cellule (NSCLC) ed in particolare negli "adenocarcinomi" ha permesso di identificare sottotipi molecolari con mutazioni sensibilizzanti che possono rappresentare il bersaglio terapeutico di farmaci di nuova generazione.

Nel laboratorio di Anatomia Patologica della ASL2 savonese, dove afferiscono i casi di tumore al polmone dell'Ospedale di Savona e di Pietra Ligure, si è sviluppata la ricerca delle mutazioni di EGFR, KRAS, BRAF, dei riarrangiamenti di ALK e ROS1 e dell'iper-espressione di PD-L1, tutti marcatori richiesti dal reparto di Oncologia.

1. IL TUMORE AL POLMONE

1.1 Incidenza

Il tumore al polmone è la prima causa di morte per neoplasia nei paesi industrializzati, rappresentando circa l'11% di tutte le nuove diagnosi di tumore. Ad oggi, per quanto riguarda l'incidenza mondiale, la sua collocazione ricade in seconda posizione in entrambi i sessi, in quanto negli uomini il tumore più comune è quello alla prostata, mentre nelle donne quello alla mammella risulta essere il più diagnosticato.

Nel 2021 in Italia abbiamo avuto circa 41.000 nuovi casi di tumore al polmone, con una maggiore frequenza nel sesso maschile: infatti la percentuale di incidenza nell'uomo, nella fascia d'età tra 50-69 anni, risulta essere del 14%, salendo al 17% dopo i 70 anni. (*Linee Guida AIOM 2021*)

Ad oggi, si stima che un uomo su nove ed una donna su trentasette possa sviluppare nel corso della sua vita una neoplasia polmonare.

1.2 Mortalità e sopravvivenza

L'80% dei casi di carcinoma polmonare giunge alla diagnosi in uno stadio già avanzato (III e IV), condizione dettata da scarsi programmi di screening e dalla tardiva comparsa dei sintomi che, nella maggior parte dei casi, non permette di attuare pratiche chirurgiche risolutive, ragion per cui gran parte dei pazienti ha una prognosi molto sfavorevole.

Secondo studi elaborati dallo IASLC (*International Association for the Staging of Lung Cancer*), le attuali stime di sopravvivenza mondiali, basate sulla stadiazione TNM, a 5 anni dalla diagnosi, variano dal 73% nella malattia allo stadio Ia, fino al 13% nella malattia allo stadio IV.

In Italia, invece, come riportato dalle *Linee Guida AIOM del 2021*, la sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi si aggira intorno al 15,8%; migliore la prognosi nella popolazione più giovane, con il 29% tra i 15 e i 44 anni, rispetto all'8% nei pazienti di età superiore ai 75 anni.

2. FATTORI DI RISCHIO

Le principali cause, responsabili di una neoplasia polmonare possono essere ricondotte sia a fattori ambientali che genetici e spesso ad un'associazione di entrambi.

Tra le cause ambientali il fumo di tabacco rappresenta il principale fattore di rischio: si ritiene, infatti, che sia il responsabile nell'85% dei casi osservati.

Nei non fumatori il carcinoma al polmone è la settima causa di decessi per cancro nel mondo. Infatti, in questi soggetti è da tenere in considerazione il fumo di tabacco ambientale, cancerogeno relativamente debole, che, però, può rappresentare, anche se solo in minoranza, una delle cause responsabili del carcinoma polmonare a livello mondiale (*Lung cancer in never smokers; Sophie Sun, Jhoan H. Schiller, Adi F. Gazdar, 7(10),778-790,2007*).

Il rischio relativo di sviluppare tumore al polmone è in stretta relazione con alcuni fattori, tra cui il numero di sigarette fumate al giorno, la durata in anni dell'abitudine al fumo ed il contenuto in catrame delle sigarette.

Il rischio relativo dei fumatori rispetto ai non fumatori aumenta di 14 volte, quello dei forti fumatori (n° sigarette fumate/die > 20) è pari a 20 volte (*Pieri L. Chiellini E., Gorini G. Epidermiol Prev, 2014*).

Per coloro che smettono di fumare, il rischio si riduce progressivamente nel corso dei 10-15 anni successivi (*Linee Guida AIOM 2021*).

Oltre al fumo di sigaretta, l'esposizione ambientale e professionale a determinate sostanze quali asbesto, cadmio, cloruro di vinile, radon, idrocarburi policiclici aromatici, l'esposizione al particolato fine e all'inquinamento atmosferico rappresentano un ulteriore fattore di rischio conosciuto per lo sviluppo di neoplasie polmonari, che possono potenziare il loro effetto cancerogeno in presenza di fumo di sigaretta.

La predisposizione genetica ed in particolare i polimorfismi genici hanno un ruolo marginale.

3. PATOGENESI

Le cellule tumorali hanno una proliferazione incontrollata e anomala che non riesce ad essere eliminata mediante i normali meccanismi di morte cellulare.

Conoscere i meccanismi alla base dei processi di proliferazione cellulare è di fondamentale importanza per la conoscenza del tumore al polmone e per la ricerca di nuove terapie farmacologiche.

I fattori di rischio noti sono in grado di provocare mutazioni al DNA e sono responsabili dell'attivazione di segnali intracellulari che inducono un'elevata proliferazione cellulare con formazione di un epitelio polmonare disomogeneo e poco differenziato.

Ad esempio, la continua esposizione al fumo di sigaretta può portare ad una iperplasia a livello dell'epitelio bronchiale.

Se lo stimolo non viene interrotto, queste cellule iperplastiche possono dare origine ad una metaplasia, in cui le cellule si trasformano da cilindriche a fusate, facendo così assumere un aspetto pavimentoso stratificato all'epitelio. La metaplasia, se lo stimolo persiste si trasforma in displasia polmonare. La metaplasia è una condizione reversibile, che cessa con l'eliminazione dello stimolo, al contrario della displasia che è una situazione irreversibile, che nel NSCLC inevitabilmente porta quasi sempre a formazione di un carcinoma in situ.

Queste sono le fasi patogenetiche del carcinoma polmonare a cellule squamose, mentre per l'adenocarcinoma e il carcinoma bronchiolo-alveolare l'alterazione preneoplastica, denominata "iperplasia adenomatosa atipica", è caratterizzata da proliferazione incontrollata di strutture ghiandolari.

In figura 1 è rappresentata l'anatomia dell'apparato respiratorio.

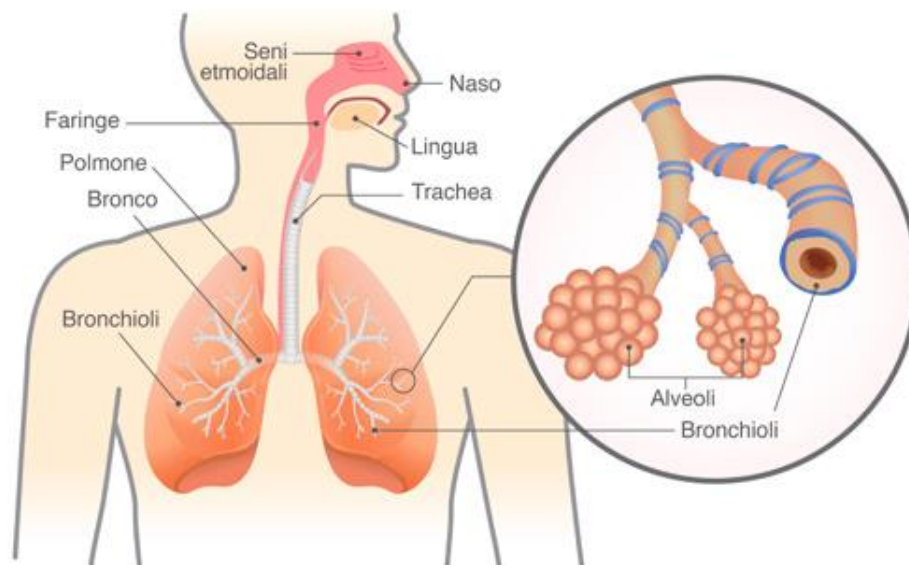


Figura 1: Anatomia dell'apparato respiratorio: trachea, bronchi e polmoni. Durante l'inspirazione, l'aria entra dal naso o dalla bocca, passa attraverso la trachea, i bronchi e i bronchioli e raggiunge quindi gli alveoli, minuscole sacche aeree dove l'ossigeno contenuto nell'aria viene ceduto al sangue.

4. ITER DIAGNOSTICO

Il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) viene generalmente diagnosticato a seguito di una visita medica effettuata per la comparsa di sintomi quali, tosse persistente, dispnea, respiro sibilante, dolore persistente al torace e spalla.

Se sussiste il sospetto di cancro al polmone, si susseguono una serie di indagini più approfondite di tipo sequenziale, partendo dalla radiografia del torace standard in due proiezioni, che però presenta dei limiti rispetto alla TAC del torace.

Di fondamentale importanza in un paziente, che sta affrontando un iter diagnostico per sospetto di neoplasia polmonare, è la PET (tomografia a emissione di positroni) che, con elevata sensibilità, è in grado di identificare possibili metastasi, permettendo anche di avere una buona valutazione del mediastino.

Per avere una diagnosi certa, è necessario però effettuare una biopsia tissutale che permette di analizzare al microscopio i frustoli di tessuto prelevati mediante ago biopsia. (Fig.2)

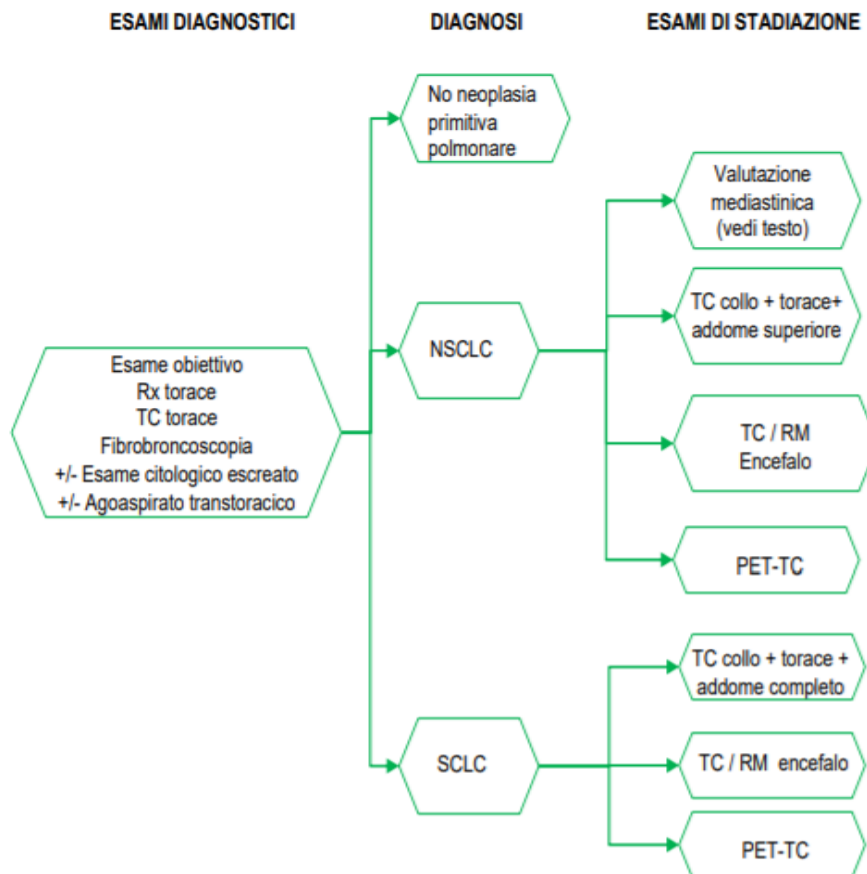


Figura 2: Iter diagnostico nel carcinoma polmonare (*Fonte AIOM 2021*).
 L'agobiopsia/biopsia transtoracica sotto TAC guidata o broncoscopia sono gli esami di scelta per effettuare quella che viene definita "tipizzazione del tumore".
 In figura è indicata una procedura di diagnosi completa sia per i tumori primari che per i tumori metastatici.

5. DIAGNOSI MICROSCOPICA

Per poter formulare una diagnosi di precisione, allo scopo di una corretta valutazione dell'istotipo e della stadiazione della neoplasia, è di fondamentale importanza avere a disposizione campioni biotici e/o citologici.

I tumori al polmone vengono distinti in tumori benigni e tumori maligni.

I tumori polmonari benigni sono forme neoplastiche che non invadono i tessuti e non metastatizzano, hanno margini ben definiti e conservano le caratteristiche tipiche del tessuto di origine. Presentandosi come papillomi o adenomi, nella maggioranza dei casi hanno prognosi favorevole.

I tumori polmonari maligni presentano, invece, una classificazione piuttosto complessa, come dettagliato nel paragrafo seguente.

5.1 *Classificazione istologica dei tumori polmonari maligni*

Da un punto di vista istologico, il riferimento per la classificazione delle neoplasie polmonari è quello proposta dalla WHO (*World Health Organization, ultimo aggiornamento 2021*).

a) *Carcinoma a piccole cellule o microcitoma (SCLC)*: è una neoplasia neuroendocrina che colpisce polmoni e bronchi con una elevata malignità e capacità metastatica. Rappresenta circa il 15-20% totale dei tumori polmonari, si sviluppa a livello bronchiale nella sottomucosa e può dare origine a processi di esfoliazione delle cellule maligne a livello del lume bronchiale, rendendo così attendibile la diagnosi citologica dell'escreato tanto quanto quella ottenuta mediante biopsia tissutale.

La diagnosi, nella maggior parte dei casi, avviene in fasi avanzate della malattia in presenza già di metastasi a livello di linfonodi regionali, midollo osseo, fegato e cervello. Spesso questo tipo di carcinoma è accompagnato da una sintomatologia tipica delle sindromi paraneoplastiche, pertanto, sintomi non dovuti alla presenza della malattia potrebbero deviare verso una diagnosi non corretta.

b) *Carcinoma non a piccole cellule o non microcitoma (NSCLC)*: ad oggi, possiede il triste primato di essere il tumore maligno più comune del polmone con una percentuale che si aggira intorno all'80%, sia nei fumatori che nei non fumatori (*Ernai V, Ganti AK. Immunotherapy in treatment advanced NSCLC. J Thorac Dis. 2018 Feb*).

Il NSCLC comprende tre diversi istotipi: *adenocarcinoma (ADC)*, *carcinoma squamoso (SQ)*, *carcinoma a grandi cellule (CGC)*.

- L'*adenocarcinoma* costituisce oltre il 50% dei tumori polmonari ed è l'istotipo più diagnosticato in entrambi i sessi (con un netto incremento nei Paesi Occidentali) e nei pazienti non fumatori. Si presenta in genere come una lesione periferica che si sviluppa a partire dalle ghiandole del parenchima polmonare con frequente coinvolgimento della pleura. L'ADC tende a metastatizzare con elevata frequenza (70-80%) ai linfonodi mediastinici, ai surreni, al fegato, alle ossa ed a livello cerebrale. Un suo sottotipo è rappresentato dall'*adenocarcinoma bronchiolo-alveolare* (crescita lepidica), derivante dal tappezzamento a livello alveolare, che tende poi a diffondersi lungo le vie aeree (Fig.3);
- il *carcinoma squamoso*, che rappresenta il 30% di tutti i tumori polmonari e che è più frequente nei fumatori, è a sede tipicamente centrale, ilare o parailare, tende a crescere sia all'interno dell'albero bronchiale sia all'esterno verso il tessuto polmonare. Nelle fasi più avanzate del tumore, il SQ può, in circa il 25% dei casi, metastatizzare a livello dei surreni e del fegato e, più frequentemente, ai linfonodi ilari, mediastinici, alla pleura ed al polmone controlaterale (Fig.4);
- il *carcinoma a grandi cellule*, 10% dei tumori polmonari, rappresenta una diagnosi di esclusione con gli altri istotipi. Localizzato principalmente nella regione subpleurica, viene considerato come un tumore periferico (Fig.5).
- il restante 10% dei tumori polmonari è rappresentato da istotipi non ben identificabili.

Il corretto approccio terapeutico, dopo ogni nuova diagnosi di NSCLC, deve essere definito alla luce dell'istotipo e del grado di estensione della malattia, e deve essere valutato mediante tecniche di imaging (TAC total body e PET), volte ad individuare l'estensione del tumore primitivo, nonché la presenza o meno di metastasi a distanza.

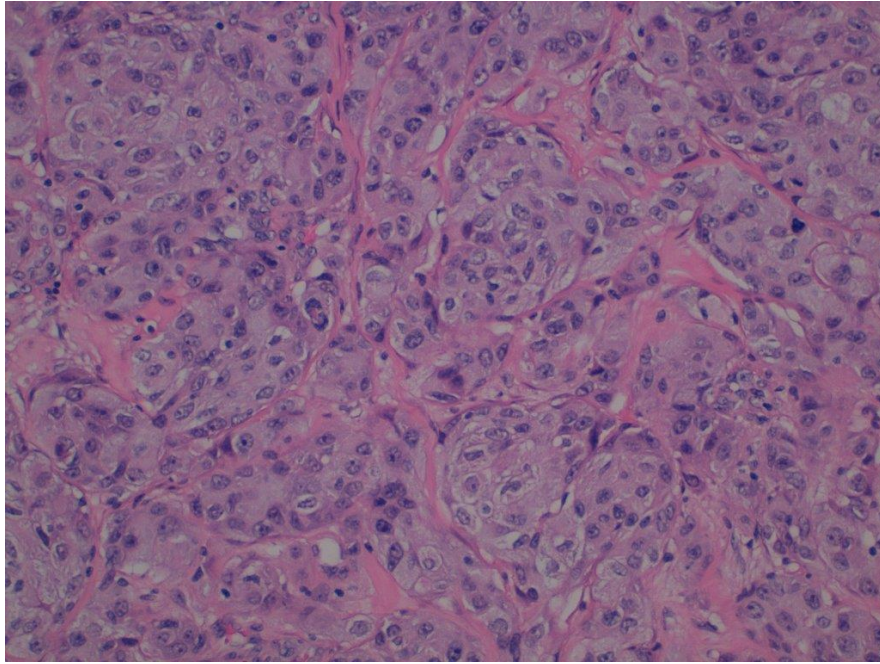


Figura 3: Ematossilina-Eosina (EE) su adenocarcinoma, ingrandimento 20x. Presenza di nidi solidi neoplastici di grande taglia, materiale neoplastico poco differenziato con aree più solide di neoplasia. Caso tipizzato con IHC (positivo per TTF-1, negativo per P40).

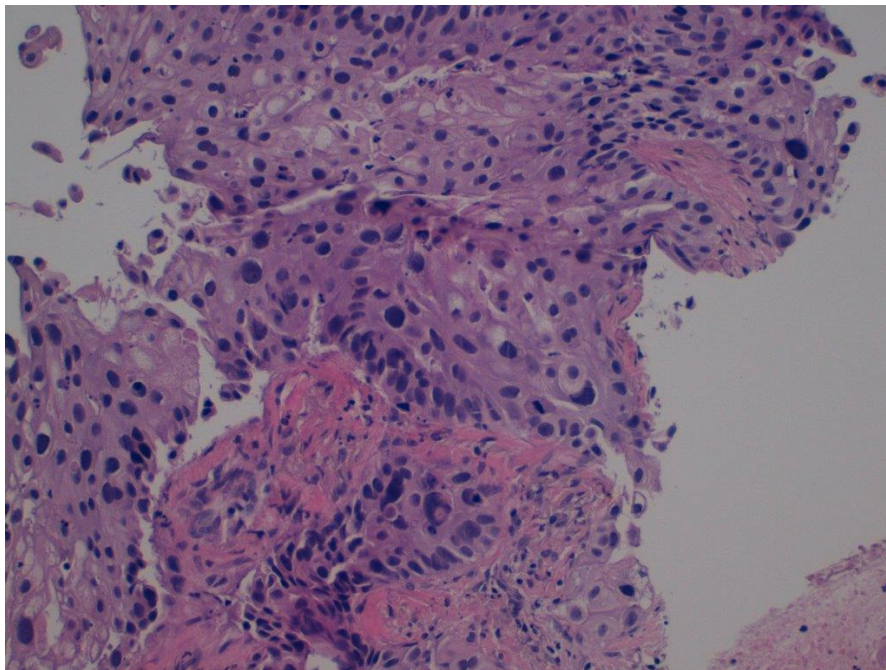


Figura 4: EE su carcinoma squamoso, ingrandimento 20x. Presenza di spine tra una cellula neoplastica e l'altra con tessuto cheratinizzante tipico di SQ.

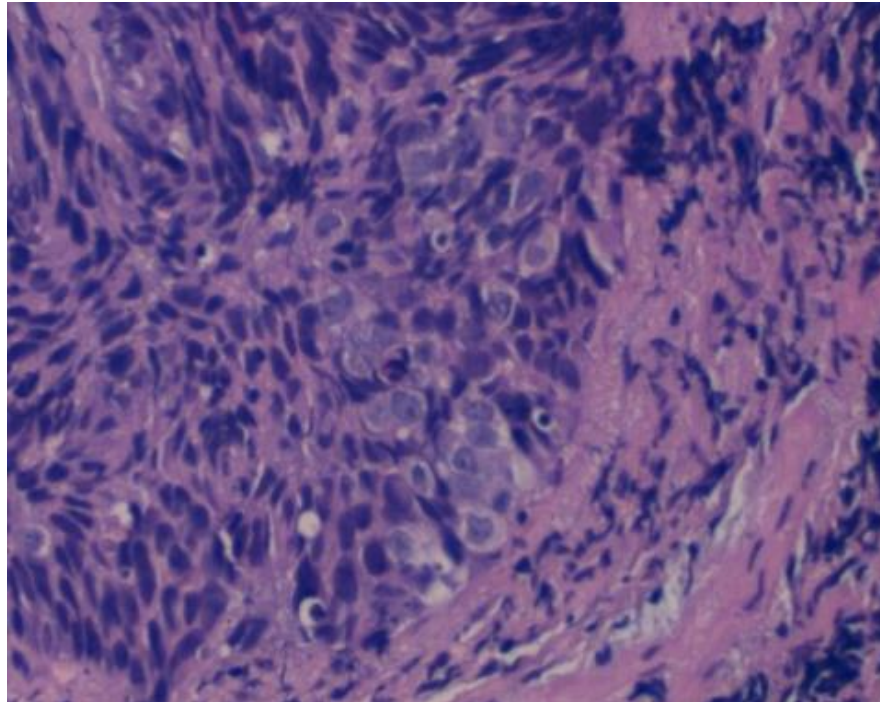


Figura 5: EE su carcinoma a grandi cellule, ingrandimento 40x. Cellule neoplastiche grandi e con abbondante citoplasma e nuclei irregolari: spesso la diagnosi avviene per esclusione rispetto agli ADC e SQ. In questa forma poco differenziata, con assenza di ghiandole e aree di cheratinizzazione, è richiesto il pannello minimo di IHC. (*vedi pag. 18*)

5.2 Il ruolo dell'immunoistochimica (IHC)

Alla diagnosi eseguita sulla base di una valutazione dei criteri morfologici convenzionali su ematossilina-eosina (EE) si affiancano oggi le indagini in immunoistochimica (IHC), che risultano fondamentali per una corretta e precisa tipizzazione dei NSCLC, in particolare dei tumori scarsamente differenziati.

L'istotipo ADC è solitamente positivo per Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1) (Fig. 6), Citocheratina 7 (CK7) (Fig. 7) e Napsina A (Fig.8); l'istotipo squamoso esprime p40, p63, citocheratine ad alto peso molecolare (es. CK5/6) e Desmocollina-3; cromogranina, sinaptofisina, CD56 sono invece i migliori marcatori invece per le neoplasie neuroendocrine. (Tabella 1)

Tuttavia, è da ricordare che anche la metodica IHC non è sempre risolutiva e, in alcuni casi, si possono riscontrare immunofenotipi anomali.

Tipo di tumore	Positività per
Adenocarcinoma	- TTF-1 - CK7 - NAPSINA A
Squamoso	- P40 - CK5/6 - CK34 βE 12 (alto peso) - DESMOCOLLINA 3 - P63
Neoplasie neuroendocrine	- CROMOGRANINA - SINAPTOFISINA - CD56

Tabella 1: marcatori in IHC per ADC e SQ.

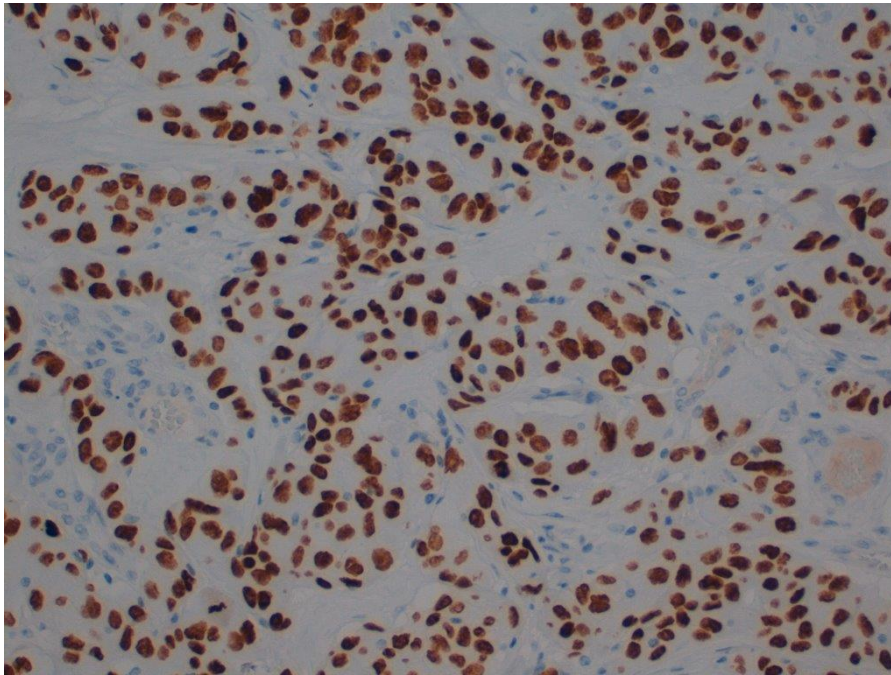


Figura 6: intensa colorazione nucleare di TTF-1 in oltre il 90% degli elementi neoplastici in un caso di ADC, ingrandimento 20x.

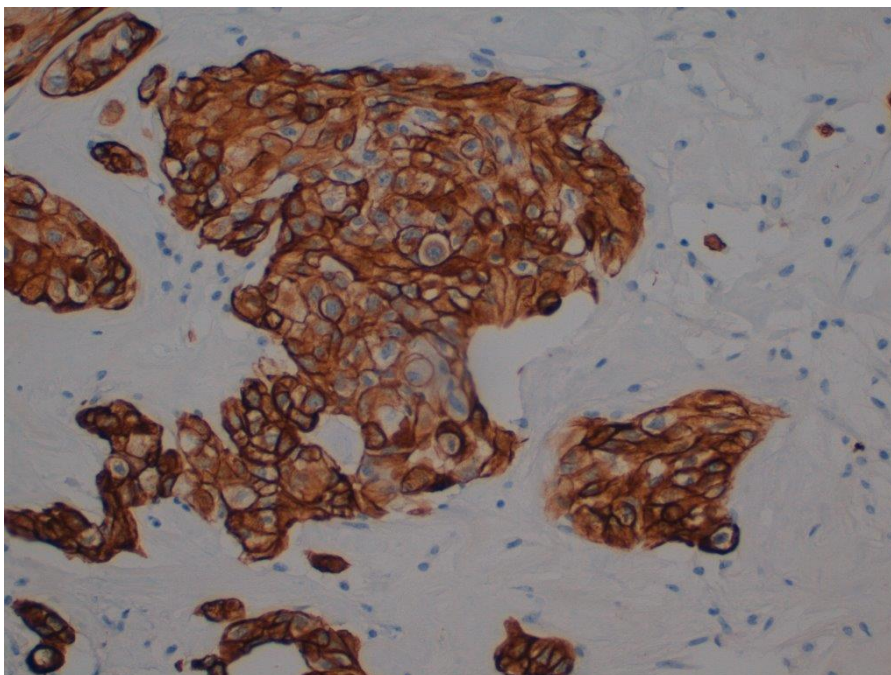


Figura 7: intensa colorazione citoplasmatica con CK7 negli elementi neoplastici in un caso di ADC, ingrandimento 20x.

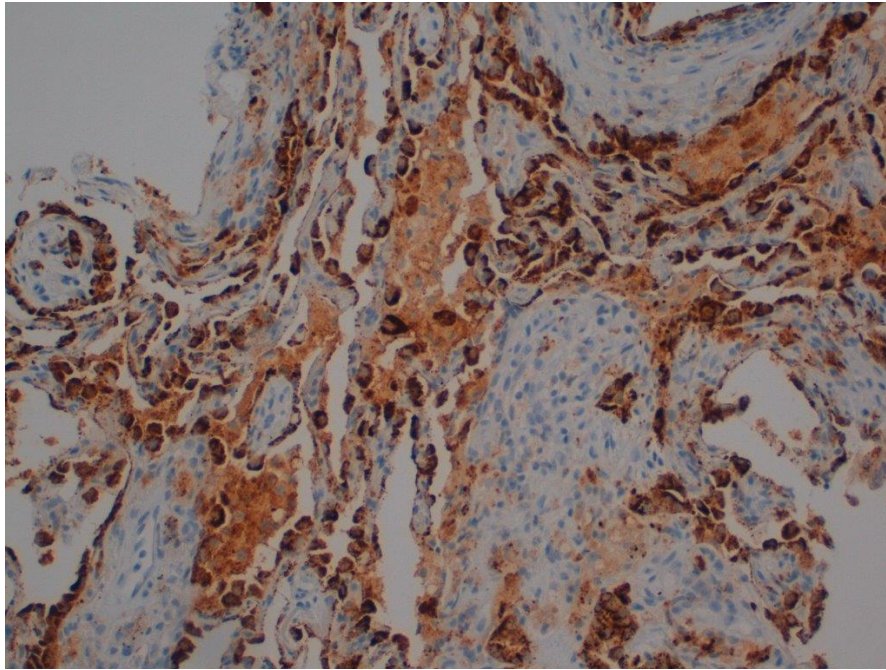


Figura 8: intensa colorazione citoplasmatica con NAPSINA A negli elementi neoplastici in un caso di ADC, ingrandimento 20x.

A causa della scarsità di materiale generalmente a disposizione nelle biopsie polmonari (e per poter preservare materiale per le indagini molecolari), la WHO suggerisce un pannello minimo di base in IHC, rappresentato da TTF-1, marcatore di ADC, in particolare il clone 8G7G3/1 che è più specifico rispetto a SPT24 e SP141 e P40 marcatore di SQ.

Nelle neoplasie polmonari a morfologia neuroendocrina, i marcatori da utilizzare per confermare la differenziazione neuroendocrina sono cromogranina, sinaptofisina e CD56.

Va sempre ricordato che possono osservarsi anche immunofenotipi anomali (ad es. ADC positivi per P40, solitamente focale).

La nuova classificazione WHO pone particolare attenzione ad un'entità piuttosto rara, il carcinoma neuroendocrino a grandi cellule "Large cell neuroendocrine carcinoma" (LCNEC), che morfologicamente può simulare un NSCLC poco differenziato e che richiede necessariamente conferma diagnostica della differenziazione neuroendocrina con indagini immunohistochimiche specifiche.

Proprio l'utilizzo non ragionato delle indagini immunohistochimiche con evidenza di aberrante e focale espressione di marcatori neuroendocrini poco specifici (es. CD56)

ha evidenziato un significativo ed indiscriminato incremento nell'incidenza di questo sottotipo, con possibili importanti ricadute terapeutiche.

Studi molecolari hanno, tuttavia, dimostrato che più del 50% dei LCNEC sono in realtà NSCLC poco differenziati ed in particolare ADC con pattern solido.

Pertanto, è raccomandabile un'attenta valutazione integrata di marcatori più specifici di differenziazione neuroendocrina (es. cromogranina e sinaptofisina) nel corretto contesto morfologico, nonché l'utilizzo di indagini molecolari di nuova generazione, quali il Sequenziamento di Nuova Generazione (NGS).

6. LA BIOLOGIA MOLECOLARE NEL TUMORE DEL POLMONE

Negli ultimi dieci anni nel NSCLC sono state identificate numerose alterazioni molecolari, capaci di condizionare attivamente l'approccio terapeutico al tumore.

Alcune alterazioni note rappresentano già un bersaglio terapeutico, mentre altre potrebbero essere la chiave per terapie future.

L'applicazione dell'oncogenomica attualmente è ascrivibile agli adenocarcinomi e non a quelli squamocellulari, non trattabili con farmaci biologici, se non per l'immunoterapia PD-L1.

Al contrario, l'indagine molecolare negli adenocarcinomi ha consentito l'identificazione di nuovi sottotipi di NSCLC.

Il trattamento terapeutico per questi specifici sottotipi è dettato dalla presenza di alterazioni molecolari specifiche, la cui identificazione permette di definire "l'identikit" del tumore.

Nel NSCLC numerosi geni presentano alterazioni molecolari dette "driver" in grado di attivare particolari pathways intracellulari, che sono alla base di una proliferazione cellulare incontrollata e della conseguente progressione tumorale.

La maggior parte dei farmaci attualmente in uso ha come bersaglio le mutazioni di EGFR, KRAS, BRAF e le traslocazioni di ALK e ROS1.

Sono allo studio, con validi risultati, altri target molecolari negli adenocarcinomi, quali HER2, NTKR e traslocazioni di RET e MET, i cui relativi farmaci sono di nuova o prossima validazione da parte degli enti internazionali.

Pertanto, sempre più nuove strategie vengono studiate e validate, con lo scopo di bloccare pathways intracellulari coinvolti nel processo di progressione neoplastica.

6.1 Fattori prognostici e predittivi

Con il termine “biomarcatore” si definisce generalmente un’alterazione molecolare specifica del tumore che può essere identificata e che può avere un significato prognostico e/o predittivo.

Un biomarcatore è definito *prognostico* quando è in grado di fornire informazioni sull’andamento della malattia indipendentemente dalla terapia che il paziente riceve o riceverà. Invece, *i marcatori predittivi* forniscono informazioni sulla terapia più adeguata da somministrare e sulla possibile risposta che il paziente potrà dare nel corso del trattamento.

L’importanza dei biomarcatori in ambito oncologico risulta oggi essere un grande punto di forza per la medicina di precisione.

I fattori che permettono di selezionare i pazienti, che hanno elevata probabilità di risposta alla terapia, definiscono la “*selezione positiva*”, mentre quei marcatori in grado di individuare i pazienti, che hanno elevate probabilità di non rispondere a una determinata terapia, rientrano nella “*selezione negativa*”.

Esempio di marcatore predittivo positivo è la mutazione di EGFR, recettore del fattore di crescita epidermico, che rappresenta un bersaglio molecolare di anticorpi monoclonali anti-EGFR capaci di bloccare la proliferazione cellulare.

Alcuni biomarcatori possono avere in contemporanea sia significato prognostico che predittivo (Tabella 2), ma ogni biomarcatore deve essere valutato nel suo contesto e distinto da neoplasia a neoplasia.

EGFR	ALK	ROS1	KRAS	BRAF	PD-L1
Prognostico	Prognostico	Prognostico	Prognostico	Prognostico	Predittivo
Predittivo	Predittivo	Predittivo	Predittivo	Predittivo	

Tabella 2: Fattori prognostici e predittivi dei diversi geni driver nel NSCLC.

6.2 Bersagli molecolari negli adenocarcinomi: mutazioni, traslocazioni e iperespressioni

Molte possono essere le anomalie genetiche, che si possono riscontrare mediante studi di Immunoistochimica (IHC), Ibridazione Fluorescente in situ (FISH), Real Time PCR (RT-PCR) in campioni bioptici e pezzi operatori derivanti da soggetti affetti da NSCLC.

L'individuazione dei diversi stati mutazionali permette di elaborare la caratterizzazione molecolare del tumore, il grading e la stadiazione, ottenendo così più informazioni possibili relative allo specifico sottotipo tumorale.

La creazione di quella che viene definita “carta d'identità tumorale” permette di avere un quadro dettagliato di ciò che sarà la prognosi e la successiva predizione alla risposta della terapia mirata.

Diversi geni sono stati individuati come bersagli molecolari nel trattamento del NSCLC, soprattutto per quanto riguarda il sottotipo ADC, diversamente da quello che avviene per il sottotipo SQ, il cui target molecolare prevede solo PD-L1.

Target molecolari valutati negli ADC (Fig.9):

- **EGFR** (*Epidermal Growth Factor Receptor*), che si trova mutato nel 10-15% dei pazienti affetti da ADC polmonari;
- **ALK** (*Anaplastic Lymphoma Kinase*), riarrangiato nel 3-7% dei casi di ADC;
- **ROS1** (*proto-oncogene1*), riarrangiato nell'1-2% di ADC
- **KRAS** (*Kirsten Rat Sarcoma*), mutato nel 20-30% degli ADC polmonari;
- **BRAF** (*Murine Sarcoma Viral Oncogen Omolog B*), mutato in circa il 2-4% degli ADC polmonari. La sua mutazione è più frequente nei tabagisti;
- **PD-L1** (*Programmed death Ligand 1*), si valuta la sua espressione in NSCLC, sia negli ADC che negli SQ: l'iperespressione di PD-L1 è legata alla possibilità di applicare l'immunoterapia.

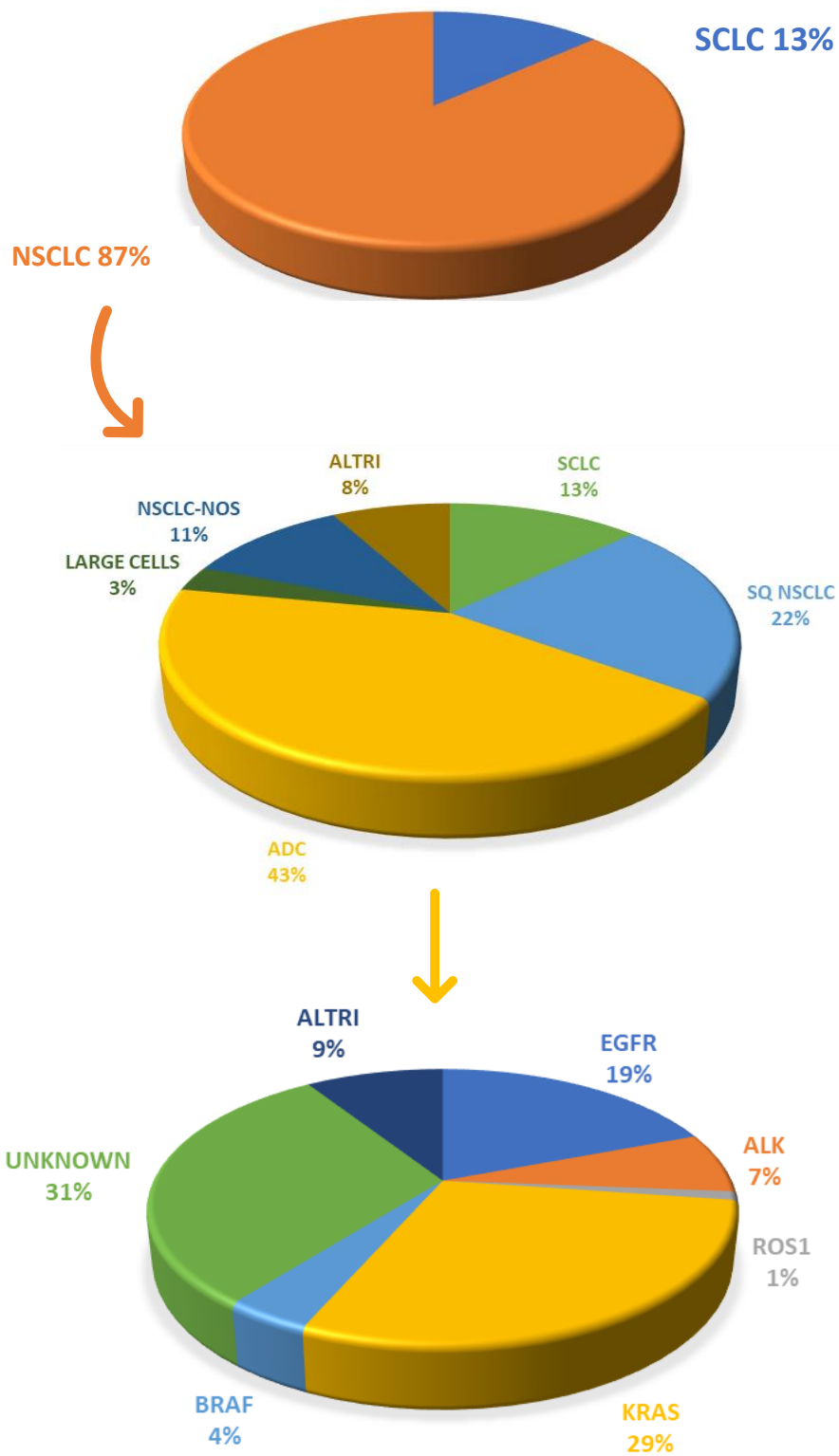


Figura 9: Frequenza di carcinomi del polmone, sottotipi e profilo molecolare di NSCLC. (Modificata dal Webinar” *Il profilo mutazionale del carcinoma polmonare*” – Università Campus Bio-Medico di Roma).

a) **EGFR** - Epidermal growth factor receptor

Si tratta di un recettore di crescita epidermico, una sua possibile mutazione puntiforme viene ricercata obbligatoriamente in tutti i casi, accertati con esame istologico, di NSCLC istotipo ADC.

Questo recettore appartiene alla famiglia di proteine ad attività tirosin-chinasica intrinseca ErbB e svolge un ruolo chiave nella fisiologia cellulare.

EGFR è una glicoproteina transmembrana di 170 Kb ed è codificata da un gene localizzato sul cromosoma 7p12 (Fig.10), espresso nei tessuti epiteliali, mesenchimali e nervosi.

Si compone di:

- un dominio extracellulare capace di legare specifici ligandi tra cui EGF, TGF- α (Transforming Growth Factor- α), anfiregulina, neuregulina
- un una porzione transmembrana
- dominio intracellulare

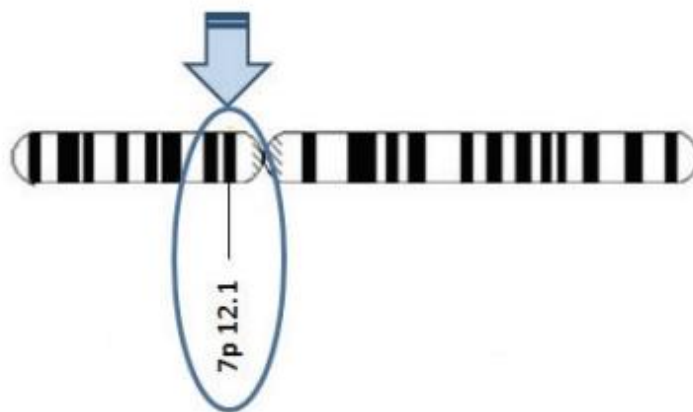


Figura 10: Localizzazione del gene di EGFR.

La famiglia ErbB presenta quattro recettori differenti. Lo studio di questi ha inizio negli anni Settanta, e le ricerche relative alla struttura e funzione molecolare di ErbB1 (EGFR) prendono subito il sopravvento, tutto ciò con l'intento di comprendere i meccanismi molecolari alla base della fosforilazione del recettore. Quest'ultima avviene in seguito al legame recettore-ligando con successiva attivazione della cascata intracellulare, che è la chiave per il passaggio delle

innumerevoli informazioni tra i diversi compartimenti cellulari fino ad arrivare al nucleo, dove si attivano i geni coinvolti nella sopravvivenza, proliferazione e differenziazione cellulare.

Il recettore EGFR si trova in due stati: inattivo e attivo.

In condizioni di riposo, EGFR si trova “autoinibito” con quella che viene definita “dimerizzazione incompetente” a livello della membrana plasmatica.

Quando però avviene il legame recettore-ligando si ha la dimerizzazione e la successiva auto-fosforilazione dei residui tirosinici presenti nel dominio intracellulare. Il recettore, così attivato, recluta proteine intracellulari attivando diverse vie di segnale (MAP-chinasi, PI3K, mTOR, JAK-STAT3) (Fig.11), il cui effetto si traduce in un’ aumentata capacità proliferativa e angiogenetica ed in una inibizione dei processi di apoptosi con conseguente maggior potenzialità di metastatizzazione da parte della cellula neoplastica

Pertanto, una iper-attivazione del gene EGFR determina stimolazione continua della proliferazione cellulare e dell’ inibizione dell’ apoptosi.

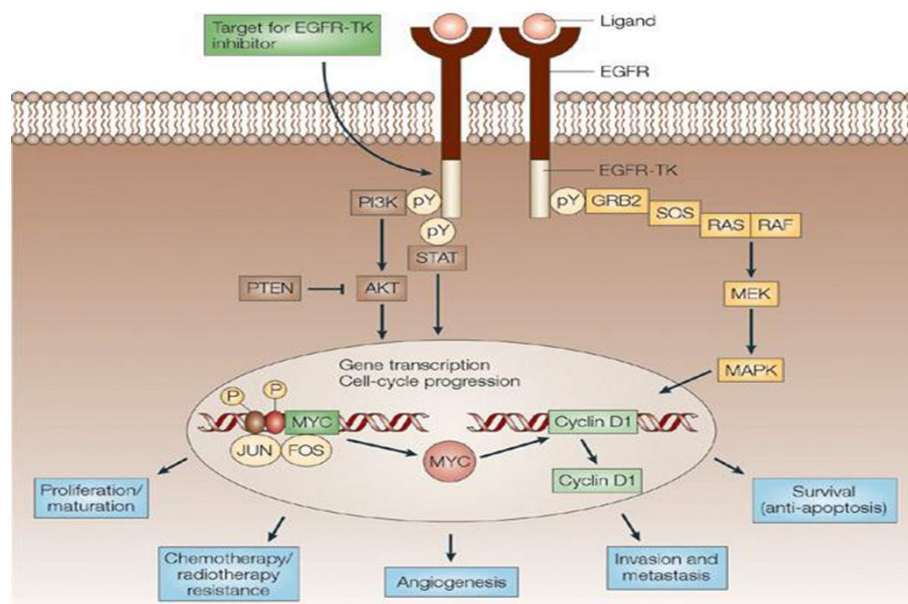


Figura 11: Via di trasduzione del segnale di EGFR. (D.S. Salomon et Coll.- *Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies*, - *Critical reviews in Oncology/hematology* 19(3) - (1995) 183-232). (Fig.11) (X. Zhang, et coll. - *An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor* - *Cell* 125(6) (2006) 1137-49).

EGFR è stato riconosciuto come il primo recettore oncogeno, tra i più diffusi nel NSCLC, ma è possibile valutare il suo stato mutazionale anche in altri tipi di tumore, tra cui in quello al seno (*Sharma Sreenath V., et al. Epidermal growth factor receptor mutations in NSCLC. Nature Reviews Cancer 2007, 3.169*).

Il trattamento delle neoplasie polmonari avanzate EGFR-mutate differisce dalle corrispettive wild-type (WT) e si avvale dell'impiego di farmaci biologici orali a bersaglio molecolare appartenenti alla famiglia degli inibitori delle tirosino-chinasi (TKI) che hanno alta efficacia e migliore tolleranza rispetto ai trattamenti chemioterapici standard. La migliore efficacia si esplica sia in termini di risposta obiettiva che di sopravvivenza globale e libera da progressione che si assesta in media fra i 10 e i 13 mesi.

Nel 10-15% degli ADC dei pazienti caucasici sono state identificate mutazioni attivanti EGFR a carico degli esoni 18, 19, 20 e 21 (Tabella 3), che predicono una sensibilità, variabile in relazione al tipo di mutazione, alle terapie a bersaglio molecolare, rappresentate dagli inibitori TKI, di prima generazione (Gefitinib ed Erlotinib), che si legano in modo reversibile ai siti di legame dell'ATP, dagli inibitori di seconda generazione, ad azione irreversibile (Afatinib, Dacomitinib) e di terza generazione per il trattamento di pazienti con mutazione T790M (Osimertinib), che bloccano in modo irreversibile (*Mok TS, et al., Improvement in overall survival in a randomized mutations. J Clin Oncol. 2018;36(22):2244-50*).

Le inserzioni dell'esone 20 di EGFR (*Sabari JK, et al. Amivantamab in post-platinum EGFR Exon 20 insertion mutant non-small cell lung cancer. IASLC 2020 World Conference on Lung Cancer Singapore; abstract OA04.04*) includono un gruppo eterogeneo di alterazioni molecolari che predicono globalmente una bassa risposta (fattore prognostico sfavorevole) a tutti gli inibitori tirosino – chinasi oggi approvati in pratica clinica. Infatti, ad oggi le inserzioni a livello di questo esone vengono indicate come mutazioni non comuni o mutazioni di resistenza e sono per questo allo studio due nuovi farmaci: Poziotinib, non ancora approvato e Mobocertinib, approvato dall'FDA (*S.S. Ramalingam et al. - Phase I/II study of mobocertinib in EGFR exon 20 insertion (ex20ins) + metastatic mNSCLC: Updated results from platinum-pretreated patients (PPP) – OncologyPRO-ESMO Congress- 10-09-2022*).

ESONE 18	ESONE 19	ESONE 20	ESONE 21
G719S	D761Y	T790M	L 861Q
G719A			L858R
G719C			
V689M			
E709K/Q			
N700D			

Tabella 3: Siti di mutazioni del gene EGFR nei rispettivi esoni. Mutazione più frequente L858R (40-45%) a livello dell'esone 21.

Resistenza a EGFR-TKI:

Un problema riscontrato frequentemente è l'inevitabile resistenza acquisita ai farmaci inibitori TKI, che deve essere distinta dalla resistenza primaria, dovuta all'assenza delle mutazioni attivanti EGFR o dalla presenza di altre mutazioni di EGFR non sensibili, oppure ancora a carico di geni diversi, come ad esempio KRAS. Questa resistenza si può rilevare, nei soggetti con mutazione dell'esone 20 di EGFR, a distanza di 9-14 mesi dall'inizio del trattamento TKI, dopo un'iniziale risposta alla terapia (WU, Ya-lan, et al. *Conventional real-time PCR-based detection of T790M using tumor tissue or blood in patients with EGFR TKI-resistant NSCLC*. 2017, 10.3307).

Pazienti resistenti a TKI possono essere studiati tramite re-biopsia o biopsia liquida alla progressione e conseguente ri-caratterizzazione molecolare (L.V. Sequist, et Al. - *Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors*, *Science translational medicine* 3(75) (2011)).

La comparsa di resistenza, presente in più dei 50% dei soggetti trattati, sarebbe da attribuire all'insorgenza, sotto la pressione selettiva del TKI, di cloni caratterizzati da aberrazioni genomiche che conferiscono alla cellula la capacità di proliferare e sopravvivere nonostante la terapia in atto.

Gli studi, che hanno identificato la presenza di questa mutazione in cloni cellulari di pazienti con mutazione EGFR nel 60-70% dei casi, depongono a favore di diverse ipotesi:

- *Insorgenza di mutazioni secondarie nel gene EGFR*

la mutazione secondaria più comune avviene nell'esone 20 (T790M) e si verifica nel 50% dei casi. Si pensa che questi soggetti possano avere una prognosi migliore rispetto ai pazienti che non sono portatori della mutazione T790M, perché indirizzabili a farmaci di TKI di terza generazione.

- *Trasformazione fenotipica*

il prelievo biotico ripetuto in pazienti con NSCLC e EGFR mutato ha mostrato in alcuni casi, anche se con una frequenza minima, una trasformazione istologica a livello fenotipico che favorisce la trasformazione di tumori NSCLC con sottotipo ADC a SCLC.

- *Attivazione di pathway alternativi*

l'attivazione dei pathway alternativi rappresenterebbe un'ulteriore causa, in particolar modo in correlazione con l'amplificazione dell'oncogene MET o con la mutazione di BRAF V600E e ALK (*Morgillo F. et al. Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: lung cancer. ESMO Open. 2016; 11; e000060.eCollection 2016*).

b) **ALK**-Anaplastic Lymphome Kinase

Il gene ALK, localizzato nel braccio corto del cromosoma 2 in posizione 23 (Fig. 12), codifica per una proteina che appartiene alla famiglia dei recettori insulina-tirosin-chinasici.



Figura 12: Localizzazione del gene ALK.

Circa il 4-5% di pazienti, affetti da adenocarcinoma polmonare non a piccole cellule, ha un'alterazione sul cromosoma 2, che porta alla fusione dell'esone 20 del gene ALK con l'esone 13 di EML4; la fusione dei due geni comporta la produzione di una proteina, EML4-ALK, responsabile della regolazione della proliferazione delle cellule (Fig.13).

Si tratta di una mutazione osservata più frequentemente nelle persone che non hanno mai fumato o fumato poco nel corso della loro vita e specialmente nelle donne asiatiche.

Il possibile riarrangiamento di ALK è conosciuto da anni come bersaglio terapeutico per il trattamento di soggetti affetti da NSCLC (*Gruber R. Kim. Detection of rearrangements and transcriptional up-regulation of ALK in FFPE NSCLC specimens using a novel, sensitive, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay, Journal of Thoracic Oncology, 2014*).

Traslocazione del gene EML4-ALK

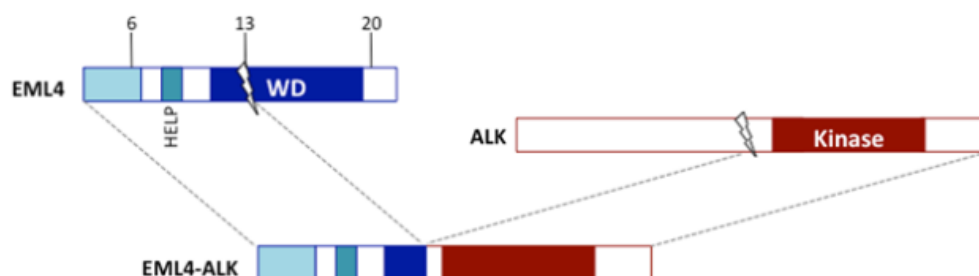


Figura 13: Riarrangiamento cromosomico tra gene EML4 e gene ALK.

La traslocazione del gene EML4-ALK è stata resa nota per la prima volta nel 2007, in un paziente di 62 anni con diagnosi di ADC del polmone. Solo 4 anni dopo è stato dimostrato che Crizotinib (inibitore della fosforilazione delle proteine di fusione di ALK, tra le quali EML4-ALK e NPM-ALK e ROS1), determinava una percentuale di risposte obiettive (riduzione delle dimensioni del tumore) nel 60% dei pazienti ed una mediana di sopravvivenza libera da progressione di quasi 10 mesi. Questi risultati sono straordinari se si considera che i pazienti arruolati erano già stati sottoposti a plurime linee di terapie antitumorali e, pertanto, che si trattava di pazienti con poche alternative terapeutiche. L'approvazione all'impiego del Crizotinib, anche in prima linea, da parte dell'AIFA, è avvenuta nel 2017.

Successivamente, sono stati prodotti altri farmaci tra cui Alectinib, inibitore di ALK di seconda generazione, approvato da AIFA nel 2018, inizialmente sviluppato con l'obiettivo di superare i meccanismi di resistenza al Crizotinib e con una migliore capacità di penetrazione della barriera emato-encefalica, aumentando quindi l'efficacia del controllo delle localizzazioni cerebrali.

Altri farmaci sviluppati e attualmente approvati in Italia sono Ceritinib e Brigatinib, ALK inibitori di seconda generazione, per il trattamento di seconda linea dei pazienti con traslocazione del gene ALK, ed utilizzati quando la malattia non è più sensibile a Crizotinib (*D Ross Camidge et al. - Brigatinib Versus Crizotinib in ALK Inhibitor-Naive Advanced ALK-Positive NSCLC: Final Results of Phase 3 ALTA-1L Trial - J Thorac Oncol. 2021 Dec;16(12):2091-2108*).

In caso di progressione dopo Alectinib, il trattamento standard di seconda linea è rappresentato da Lorlatinib, un inibitore di ALK di terza generazione, sviluppato per

superare i meccanismi di resistenza a Crizotinib, Ceritinib e Alectinib e anche lui in grado di attraversare la barriera emato-encefalica risultando, quindi, efficace nei confronti delle localizzazioni cerebrali.

TRASLOCAZIONI DI ALK

NEOPLASIA	PRINCIPALE ALTERAZIONE	PRINCIPALI GENI COINVOLTI	FREQUENZA
LNH anaplastico	Traslocazione (2;5)	ALK-nucelofosmina	60-85%
NSCLC	Inversione chr 2	EMLA4-ALK	3-7%
Basalioma	Iperespressione	ALK	100%
K mammella	Inversione Chr 2	EMLA4-ALK	2,4%
Neuroblastoma	Iperespressione	ALK	50%
K colonrettale	Inversione chr2	EMLA4-ALK	2,4%
K squamocell. Esofago	fusione	TPM4-ALK	20%

Tabella 4: Possibili traslocazioni del gene ALK nelle diverse neoplasie.

c) **ROS1** - Oncogene c

Il gene ROS1 si trova sul braccio lungo del cromosoma 6 in posizione 6q22 (Fig. 14) e codifica per un recettore di membrana con attività tirosino-chinasica.

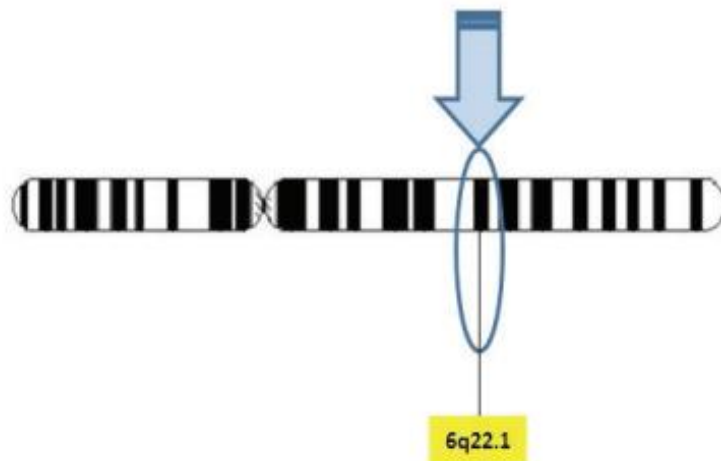


Figura 14: Localizzazione del gene ROS1.

A causa di eventi accidentali, una parte del gene ROS1 (la sua porzione con attività tirosin-chinasica) si stacca e si unisce alla porzione di un altro gene. Il risultato è la formazione di un nuovo gene, che può dare origine allo sviluppo di un adenocarcinoma del polmone.

Il primo riarrangiamento ad essere stato descritto deriva dalla fusione di ROS1 con *SDC4* (Zhu Y, Xu C, Ye X, Yin M, Zhang J, Du K, et al.) ma, ad oggi, si conoscono 27 pattern di fusione con cui la regione 3' del gene ROS1 può poi andarsi a fondere. Il più frequente è il riarrangiamento con CD74 (Tabella 5).

PARTNER FUSIONE ROS1	DI CON	TIPO DI TUMORE ALLA SCOPERTA	LOCALIZZAZION E CROMOSOMA
TPM3		ADK Polmone	1q21.3
TFG		T. infiammatorio miofibroblasti co	3q12.2
SLC34A2		NSCLC	4p15.2
CD74		NSCLC	5q13.2
PWWP2A		T. Spitzoide	5q33.3
HLA-A		T. Spitzoide	6p22.1
GOPC		Glioblastoma	6q22.1
CEP85L		Angiosarcoma	6q22.31
TPD52L1		NSCLC Adenosquamo so	6q22.31
EZR		ADK Polmone	6q25.3
TMEM106 B		ADK Polmone	7p21.3
KDEL2		NSCLC	7p21.1
CCDC6		ADK Polmone	10q21.2
NFkB2		Linfoma a grandi cell anaplastico	10q24.32

KIAA1598	T. Spitzoide	10q25.3
PPFIBP1	T. Spitzoide	12p11.22
ERC1	T. Spitzoide	12p13.33
LIMA1	ADK Polmone	12q13.12
LRGIG3	ADK Polmone	12q14.1
CLIP1	T. Spitzoide	12q24.31
ZCCHC8	T. Spitzoide	12q24.31
NCOR2	Linfoma a grandi cell anaplastico	12q24.31
MYO5A	T. Spitzoide	15q21.2
YWHAE	T. infiammatorio miofibroblastico	17p13.3
CLTC	ADK Polmone	17q23.1
SDC4	ADK Polmone	20q13.12
MSN	ADK Polmone	XQ12

Tabella 5: Pattern di fusione noti di ROS1 (*immagine modificata da IASLC ATLAS OF ALK AND ROS1 TESTING IN NSCLC*).

Il riarrangiamento dell'oncogene c-ROS1 si osserva in circa l'1-2% dei NSCLC, principalmente nei pazienti con diagnosi di adenocarcinoma, non fumatori e di età inferiore ai 40 anni (*Linee guida AIOM 2020*). Questa traslocazione porta alla formazione di una proteina ROS con dominio tirosino-chinasico del gene ROS1.

Il dominio tirosino chinasi del gene ROS1 ha il 49% di omologia con quello del gene ALK. Per questo motivo, alcuni ALK inibitori sono efficaci anche nei pazienti con riarrangiamento del gene ROS (*Zhu Q. e coll. Driver genes in non-small cell lung cancer: characteristics, detection methods, and targeted therapies - Oncotarget, 2017*).

Il riarrangiamento di questo gene è stato già riscontrato in molteplici neoplasie, le quali poi sono risultate molto sensibili a terapie con farmaci inibitori dei recettori tirosin-chinasi.

I tumori polmonari ROS1 positivi tendono ad essere molto aggressivi ed a metastatizzare, ma paradossalmente, presentano una risposta senza precedenti alla terapia mirata anti-ROS1. Il trattamento, approvato recentemente, non consente di stimare quale sarà l'aspettativa di vita mediana, ma i dati raccolti finora sono incoraggianti. Da uno studio emerge che il tempo medio di efficacia del farmaco è di circa 17 mesi.

È recentissima l'approvazione da parte dell'Agenzia Italiana del Farmaco dell'immissione in commercio e della rimborsabilità di Entrectinib di Roche per il trattamento di pazienti adulti con carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) in stadio avanzato ROS1-positivo non precedentemente trattati con inibitori di ROS1 (*Quotidianosanita.it - 14 settembre 2021*).

d) **KRAS** - Kirsten Rat Sarcoma

Il gene KRAS è localizzato sul braccio corto del cromosoma 12 (Fig. 15).



Figura 15: Localizzazione del gene KRAS.

La proteina codificata, KRAS, si trova a valle del recettore EGFR. Alcuni tumori presentano una mutazione a carico del gene KRAS, cui consegue la produzione di una proteina KRAS anomala. La proteina anomala è sempre attiva e può stimolare la crescita cellulare anche in assenza del segnale fornito a monte da EGFR e dalle proteine tirosino-chinasiche. Circa il 30%-40% dei tumori al colon e il 15%-30% dei tumori polmonari hanno mutazioni a carico di KRAS.

Quando si attivano, le proteine RAS agiscono da attivatori di diversi effettori citosolici tra cui BRAF, mTOR e PI3K.

Gli stati mutazionali, che coinvolgono il gene KRAS, avvengono a livello dei codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146 (Tabella 6). Oltre l'80% dei tumori con *KRAS* mutato presenta variazioni a singolo nucleotide nel codone 12. La G12C è la mutazione di *KRAS* prevalente nel NSCLC ed è presente in circa il 13% degli adenocarcinomi del polmone (Zhu Q., et al *Driver genes in non-small cell lung cancer: characteristics, detection methods, and targeted therapies*, 2017).

Per quanto riguarda l'iter terapeutico, che prevede l'utilizzo di farmaci con bersaglio molecolare KRAS, i risultati ottenuti, fino ad oggi, non sono omogenei. Infatti, si pensa che questa mutazione sia un fattore prognostico negativo associabile ad una maggior resistenza ai farmaci anti-EGFR (inibitori delle tirosin-chinasi, TKI).

Questo evidenzia il fatto che attualmente c'è un disperato bisogno di terapie specifiche per i pazienti affetti da NSCLC con mutazione di KRAS (*Gregory J. Riely, Jenifer Marks, and William Pao, 2008*).

Il 22 Aprile 2022 la FDA ha approvato Sotorasib per il trattamento dei pazienti adulti con tumore del polmone non a piccole cellule localmente avanzato o metastatico, con mutazione KRAS G12C, che hanno ricevuto almeno una precedente terapia sistemica senza effetti.

È allo studio un nuovo farmaco, Adagrasib, che sta dando buone risposte anche a livello di metastasi cerebrali (*A.I. Spira, et al. KRYSTAL-1: activity and safety of adagrasib (MRTX849) in patients with advanced/metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring a KRAS G12C mutation. J Clin Oncol 2022;40(suppl 16):9002*).

MUTAZIONI KRAS

MUTAZIONI COD 12	MUTAZIONI COD 13
Valina G12V	Asparagina G13D
Alanina G12A	Arginina G13R
Asparagina G12D	Cisteina G13C
Serina G12S	
Arginina G12R	

Tabelle 6: Possibili mutazioni del gene KRAS.

e) **BRAF** - Murine Sarcoma Viral Oncogen Omolog B

Il gene BRAF è situato sul cromosoma 7 (Fig. 16) e codifica per la proteina BRAF. Questo gene è indicato anche come protooncogene BRAF, mentre la proteina è meglio conosciuta come proteina BRAF serina/treonina chinasi (Sithanandam G, et al. “Complete coding sequence of a human BRAF cDNA and detection of Braf protein chinase con isozyme specific anticorpi Oncogene, vol. 5, n° 12, dicembre 1990, p. 1775–80).



Figura 16: Localizzazione del gene BRAF sul cromosoma 7.

Questa proteina, coinvolta nella via di segnalazione di RAS/RAF/ERK, agisce sulla proliferazione cellulare e si trova mutata in alcuni tipi di cancro, tra cui il melanoma e nel 4% dei pazienti con tumore del polmone non a piccole cellule (Caparica, Rafael, et al. *BRAF mutations in non-small cell lung cancer*, 2016, 101:32-39).

La mutazione BRAFV600E è una tra le più frequenti (50-70%) (Linee guida AIOM 2020), è localizzata a livello dell'esone 15, consiste nella sostituzione della valina con acido glutammico nel codone 600 e rappresenta circa il 50 % delle mutazioni BRAF negli ADC.

Le mutazioni di BRAF, considerate dei driver oncogenici alternativi nel NSCLC, portano ad un'attivazione costitutiva delle vie di segnalazione cellulare a valle della MAP chinasi, e risultano essere più frequenti nei fumatori (Fig.17).

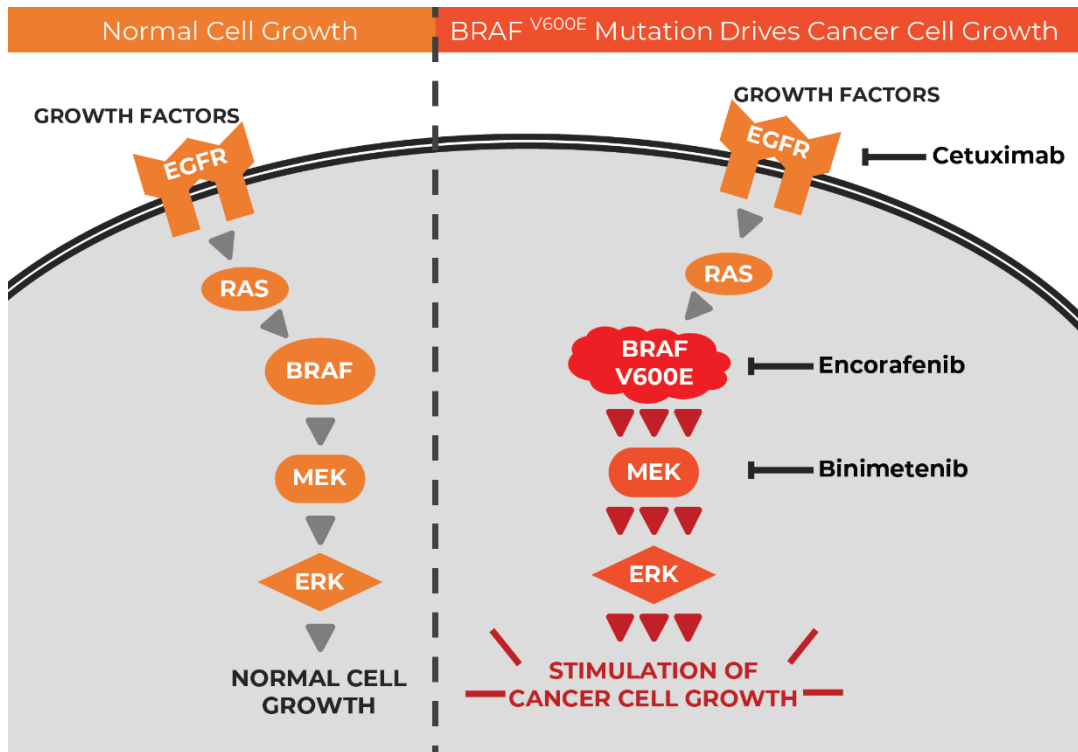


Figura 17: Via di trasduzione del segnale EGFR/RAS/BRAF in cellule non mutate e in cellule con mutazione V600E del gene BRAF.

Uno studio di fase 2 ha valutato l'efficacia della terapia combinata Dabrafenib + Trametinib in 59 pazienti con diagnosi di NSCLC e con presenza della mutazione BRAF V600E precedentemente sottoposti ad almeno una linea di chemioterapia. Lo studio ha dimostrato una percentuale di risposte obiettive del 63%, con una sopravvivenza libera da progressione di circa 10 mesi. Sulla base dei risultati di questo studio, dal mese di dicembre 2019, anche in Italia, la terapia Dabrafenib + Trametinib è stata approvata e rimborsata per il trattamento di pazienti adulti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato positivo alla mutazione BRAFV600. (Planchard D, Johnson BE - BRAF Adds an Additional Piece of the Puzzle to Precision Oncology-Based Treatment Strategies in Lung Cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(7):796–797).

f) *Programmed death – PD-1 e PD-L1*

L'immunoterapia basata sugli inibitori dei "checkpoint immunitari" come PD-1 e PD-L1 ha permesso di rivoluzionare il trattamento di alcuni tumori prima incurabili ed è diventata uno dei pilastri dell'innovazione per la terapia del cancro.

Una proteina transmembrana della famiglia delle immunoglobuline CD28/CTLA-4, chiamata PD-1 (PROGRAMMED DEATH-1), localizzata sulle cellule del sistema immunitario e sui linfociti T attivati, svolge un ruolo chiave di regolazione, controllando che l'attivazione delle cellule T avvenga solo quando necessario ed esercitando un'azione inibitrice a livello dei linfociti T.

PD-1 è dotata di due ligandi: PD-L1 e PD-L2 (PROGRAMMED DEATH-LIGAND) (Fig. 18), anch'essi espressi sulle cellule del sistema immunitario. L'interazione tra PD-1 e PD-L1/2 regola in generale le risposte immunitarie e negativamente il signalling delle cellule T. Questo legame a livello delle cellule del sistema immunitario favorisce l'inattivazione della risposta immunitaria quando non necessaria.

Una delle strategie delle cellule tumorali è la loro capacità di elusione dal sistema immunitario. Questo è possibile perché le cellule tumorali esprimono sulla loro membrana cellulare PD-L1 e tale espressione, strategica, fa sì che ci sia una inattivazione globale dei linfociti T (*Lantuejoul S, et al. Programmed death ligand 1 immunohistochemistry in non-small cell lung carcinoma. J Thorac Dis. 2019;11(Suppl 1): S89-S101*).

In diversi tumori, soprattutto solidi come il NSCLC e il melanoma, e nel microambiente tumorale può essere presente una iper-espressione di PD-L1.

Il legame di PD-1 con PD-L1, espresso nelle cellule neoplastiche, fa sì che l'attività citotossica esercitata dalle cellule T del sistema immunitario venga meno e pertanto, la funzione esercitata dai linfociti T sulle cellule tumorali venga soppressa (Fig.18).

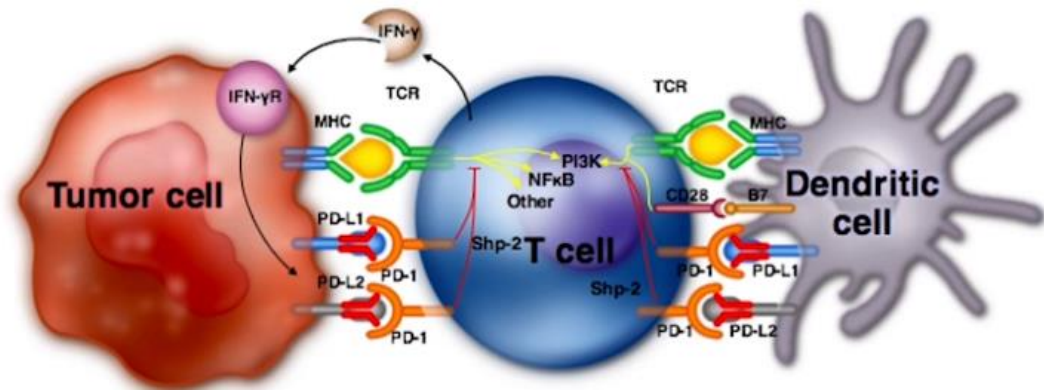


Figura 18: Ruolo di PD1/PD-L1 nel pathway di soppressione dell'immunità antitumorale.

Recentemente, sono state sviluppate terapie mirate antitumorali, capaci di riattivare la risposta immunitaria guidata dalle cellule T. Sono stati sviluppati farmaci che agiscono sul check-point immunitario PD-1/PD-L1 e che sono quindi capaci di bloccare l'interazione tra PD-1 e PD-L1, ripristinando così la funzione dei linfociti T (Fig.19).

L'espressione di PD-L1 può variare e di conseguenza la risposta al farmaco specifico: pazienti con NSCLC e con iperespressione di PD-L1 hanno una maggiore possibilità di rispondere alle terapie anti-PD1/PD-L1, rispetto a soggetti con bassa espressione, che risultano quindi non candidabili a immunoterapia con Novilumab, Durvalumab, Atezoluzumab (*Brody Robert, et al. PD-L1 expression in advanced NSCLC: insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review. Lung Cancer, 2017, 112: 200-215*).

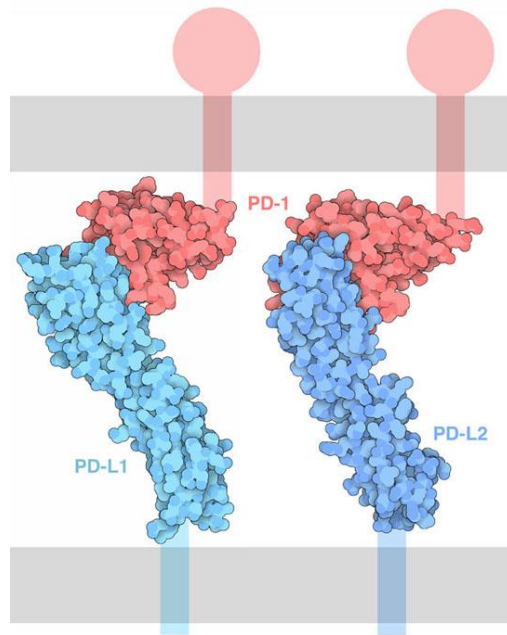


Figura 19: Legame recettore-ligando PD-1 – PD-L1 in NSCLC. PD-1 (in rosso) si estende fuori dalla superficie dei linfociti-T e si può legare a due proteine ligandi simili, PD-L1 e PD-L2 (in azzurro e blu, iperesprese nella maggior parte dei NSCLC), determinando quindi un forte legame tra recettore e ligando endogeno.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati dei trattamenti antitumorali specifici (es. Nivolumab e Pembrolizumab) che determinano un blocco tra PD-1 e PD-L1, ripristinando così la funzione dei linfociti T e una corretta risposta immunitaria nei confronti del tumore (Fig.20).

Il rovescio della medaglia di questi trattamenti è dato dal fatto che questi pazienti presentano un maggiore rischio di sviluppare reazioni autoimmuni.

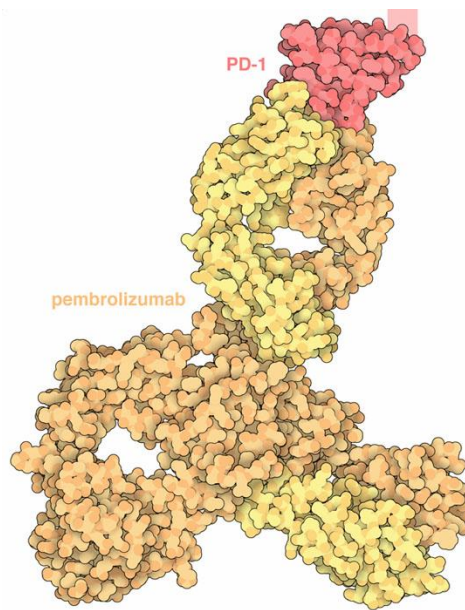


Figura 20: Legame recettore-farmaco. Il farmaco, mostrato nell'immagine, è un anticorpo, il cui nome commerciale è Pembrolizumab, e si lega a PD-1 bloccando il sito sul quale si può legare PD-L1.

7. TRATTAMENTO E TERAPIA

La caratterizzazione molecolare della neoplasia permette di indirizzare il paziente verso terapie mirate. Qualora invece non vengano riscontrate nella neoplasia stati mutazionali, l'unica arma a disposizione rimane la chemioterapia e/o radioterapia, in generale con ridotta azione nei confronti del tumore, e si parla pertanto di prognosi sfavorevole.

La terapia del tumore al polmone nel tempo ha avuto un grande sviluppo. Già negli anni '90 era emerso il beneficio di un trattamento chemioterapico a base di platino quale prima linea di trattamento in pazienti con malattia avanzata e successivamente confermato da studi che hanno dimostrato maggior tollerabilità ed efficacia delle associazioni fra platino e i nuovi farmaci di terza generazione (Gemcitabina, Vinorelbina, Docetaxel, Paclitaxel).

In particolare, per le neoplasie non-squamose, negli ultimi anni sono stati introdotti un nuovo antimetabolita, Pemetrexed, che, associato a platino, si è dimostrato la miglior opzione terapeutica in prima linea, ed un farmaco biologico antiangiogenetico, Bevacizumab, che, associato alla chemioterapia, ha determinato un vantaggio in sopravvivenza libera da malattia e globale (*Cortellini A., Gambale E., Cannita K., Barocco D., Parisi A., Napoleoni, Masedu F. Thoracic Cancer 9(2), 241-252, 2018*).

Tali trattamenti hanno portato la mediana di sopravvivenza di questi pazienti oltre l'anno di vita.

Recentemente, numerosi studi hanno valutato strategie di mantenimento dopo un trattamento di prima linea dimostrando un vantaggio in termini di sopravvivenza globale.

Infine, diversi sono i farmaci registrati per il trattamento di seconda linea del NSCLC avanzato tra cui Docetaxel da solo e in associazione a Nintedanib (inibitore dell'angiogenesi) e Pemetrexed.

L'identificazione delle alterazioni molecolari nel NSCLC, che condizionano la biologia del tumore, ha reso possibile lo studio di terapie mirate a bersaglio molecolare.

I trattamenti con farmaci a bersaglio molecolare, in pazienti con mutazioni di *EGFR* (*Erlotinib, Gefitinib e Afatinib*, inibitori tirosin-chinasici di EGFR) e riarrangiamenti

di *ALK* e *ROS1* (*Crizotinib* e *Enterctinib*, inibitori tirosin-chinasici di ALK) si sono dimostrati nettamente superiori alla chemioterapia standard nei pazienti con malattia avanzata.

Enterctinib, per riarrangiamento di ROS1-ALK, riesce a superare la barriera emato-encefalica permettendo di trattare con evidente efficacia anche le metastasi cerebrali, che un tempo vedevano nella chemioterapia l'unica possibilità terapeutica. Una delle ultime innovazioni farmacologiche, applicate in ambito oncologico e in particolar modo nel tumore al polmone, riguarda l'uso dell'*immunoterapia*, cioè l'impiego di molecole in grado di agire su check-point immunitari potenziando l'attività del sistema immunitario nei confronti del tumore. Il *Pembrolizumab*, anticorpo monoclonale diretto contro PD-1 ha mostrato ottimi risultati rispetto alla chemioterapia standard in pazienti con NSCLC avanzato selezionati positivamente per l'alta espressione (>50%) di PD-L1 sulle cellule neoplastiche, prescindendo dall'istotipo.

Nel trattamento di seconda linea, il Pembrolizumab è somministrato a pazienti con espressione di PD-L1 >1% ed è affiancato al Nivolumab (anticorpo anti-PD-1) che può essere somministrato sia nei pazienti con adenocarcinoma che in quelli con carcinoma squamoso a prescindere dall'espressione di PD-L1.

Poiché al giorno d'oggi è possibile associare una terapia biologica alle mutazioni dei geni EGFR, ALK e ROS1, questi ultimi sono i marcatori molecolari più richiesti dagli oncologi.

In definitiva, le possibilità terapeutiche, attualmente disponibili in Italia, per i pazienti con NSCLC in stadio III e IV, approvate e convenzionate dal Sistema Sanitario Nazionale sono quelle a bersaglio molecolare per:

- EGFR
- ALK
- ROS1
- BRAF
- PD-L1
- NTRAK (non ancora valutato nel Laboratorio di Anatomia Patologica di Pietra Ligure).

GENI	ALTERAZIONE	FREQUENZA	TERAPIA
EGFR	MUTAZIONE	15-25%	GEFITINIB ERLOTINIB AFATINIB OSIMERTINIB Per inserzione esone 20: POZIOTINIB MOBOCENTINIB
ALK	RIARRANGIAMENTO	3-7%	CRIZOTINIB ALECTINIB BRIGANTINIB
ROS1	RIARRANGIAMENTO	1-2%	CRIZOTINIB ENTRECTINIB
KRAS	MUTAZIONE	29%	SOTORASIB ADAGRISIB
BRAF	MUTAZIONE	2-4%	DABRAFENIB TRAMETINIB ADAGRASIB
PDL-L1	IPERESPRESSIONE	-	NOVILUMAB DURVALUMAB ATEZOLUZUMAB

Tabella 7: Principali geni driver con valore prognostico/predittivo nel NSCLC.

8. BIOPSIA LIQUIDA

La biopsia liquida è una tecnica che utilizza come matrice di partenza liquidi biologici quali, saliva, urina, liquido pleurico, liquor, anche se i risultati più importanti sono stati ottenuti, al momento, sul prelievo di sangue. Non si esclude però in futuro di poter utilizzare nella pratica clinica anche altri liquidi biologici.

Tale tecnica permette di ricercare, mediante campione a disposizione, cellule circolanti tumorali e DNA circolante tumorale.

L'utilizzo della biopsia liquida è stato raccomandato nella ricerca e nell'iter diagnostico di soggetti affetti da NSCLC con resistenza ai farmaci di I generazione per la ricerca della mutazione acquisita T790M esone 20.

Infatti, pazienti con questo tipo di neoplasia, trattati con farmaci a bersaglio molecolare specifico, mostrano, nel 60% dei casi, ad un anno dall'inizio del trattamento quella che viene definita "farmaco resistenza" acquisita.

Se la biopsia tissutale, essenziale per la diagnosi e la stadiazione, ci fornisce informazioni relative alla condizione del soggetto al tempo zero, la biopsia liquida permette di valutare la progressione della malattia, attraverso la ricerca di possibili nuove mutazioni responsabili della resistenza acquisita a questi farmaci (in particolare nel NSCLC EGFR T790M) (*WU, Ya-lan, et al. Conventional real-time PCR-based detection of T790M using tumor tissue or blood in patients with EGFR TKI-resistant NSCLC. 2017, 10.3307*).

Pertanto, la biopsia tissutale è la procedura standard per la diagnosi, per la ricerca di possibili mutazioni ed è fondamentale per il processo decisionale e terapeutico in soggetti con NSCLC avanzato, mentre la biopsia liquida risulta essere l'unica strada percorribile per ulteriori accertamenti nella progressione neoplastica qualora il tessuto tumorale non sia disponibile, soprattutto per le condizioni cliniche del soggetto. La biopsia è pur sempre un esame invasivo, che può portare ad alcune complicanze quali, pneumotorace in seguito ad ago-biopsia polmonare.

Invece la biopsia liquida, non invasiva e di facile accessibilità, è una buona tecnica, facilmente ripetibile nel corso della malattia, che permette di elaborare il profilo molecolare e di monitorare la possibile comparsa di nuove mutazioni responsabili della resistenza ai farmaci, che ad oggi risultano essere una delle complicanze più

diffuse nei soggetti NSCLC trattati con terapie personalizzate (WU, Zhen, et al. *Update on liquid biopsy in clinical management of NSCLC. Oncotargets and therapy* 2019, 12.5097).

9. SCOPO

In quest'ultimo decennio, con l'evolversi degli studi biologici e di caratterizzazione molecolare coinvolti nello sviluppo e progressione del carcinoma polmonare, il trattamento della malattia metastatica ha subito una notevole trasformazione. Questo si è tradotto nello sviluppo di nuovi farmaci a bersaglio molecolare, le cosiddette "target therapies".

Negli ultimi anni, nel NSCLC sono stati identificati diversi marcatori, sia prognostici sia predittivi. La ricerca di questi marcatori sta aprendo una nuova frontiera di speranza in quei casi di diagnosi di tumore al polmone NSCLC metastatici e inoperabili, in particolare negli adenocarcinomi.

Ad esempio, la scoperta di specifiche mutazioni a carico del gene EGFR e la loro successiva approvazione in pazienti con NSCLC in stadio IV EGFR mutati ha rappresentato un importante fattore predittivo di risposta agli inibitori delle tirosin-chinasi. Con l'introduzione di queste terapie a bersaglio molecolare è stato possibile ottenere tassi di risposta quasi del 70%, fino a poco tempo fa impensabili in questa patologia, con sopravvivenze mediane superiori a 20 mesi.

Analogamente con l'identificazione del gene di fusione ALK-EML4 negli ADC, il fattore predittivo di risposta al trattamento con Crizotinib ha portato all'approvazione di tale farmaco in prima linea in pazienti con ALK riarrangiato. In questa sottopopolazione, l'impiego di Crizotinib ha ottenuto risposte obiettive del 60% e sopravvivenza libera da progressione di circa 10 mesi.

L'implementazione della strategia terapeutica con questi farmaci di nuova generazione è stata un chiaro esempio di medicina personalizzata in cui la scelta del farmaco viene effettuata sulla base dell'identificazione di specifiche mutazioni driver. Con la necessità di individuare questi nuovi fattori anche il laboratorio di Anatomia Patologica si è dovuto aggiornare, per poter fornire risposte e nuovi strumenti terapeutici alle richieste degli oncologi. Nuove tecniche e metodologie di indagine come immunohistochimica (IHC), ibridazione in situ fluorescente (FISH), real time-PCR (RT-PCR) e next-generation sequencing (NGS) sono state introdotte.

Oggi si è resa quindi indispensabile la ricerca di fattori predittivi come: l'oncogene di fusione ALK e i riarrangiamenti di ROS1 (con tecniche di IHC e FISH); le

mutazioni sensibilizzanti di EGFR e le mutazioni di BRAF V600E e KRAS G12C (con tecniche di RT-PCR); l'iperespressione di PD-L1 (con tecniche di IHC).

Lo scopo dello studio oggetto di questa tesi è stato quindi di valutare l'algoritmo diagnostico che prevede uno screening di tutte le neoplasie polmonari NSCLC inizialmente non operabili.

10. MATERIALI E METODI

10.1. Selezione dei casi

Nel periodo compreso tra gli anni 2021 e 2022 presso il Laboratorio di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliera – Santa Corona di Pietra Ligure, sono stati sottoposti a caratterizzazione molecolare 133 casi di NSCLC di pazienti con tumori di dimensioni maggiori di 3 cm o non operabili o metastatici (stadio III e IV).

I tessuti utilizzati in questo studio sono principalmente prelievi istologici di piccole biopsie polmonari, sia primarie che metastatiche.

Il campione arriva in laboratorio in appositi contenitori, già immerso nel fissativo, in particolare formalina, che conserva la morfologia strutturale, antigenica e molecolare evitandone la degradazione.

Il campione è sempre accompagnato dalla sua richiesta di accettazione per poter mantenere attiva la rintracciabilità all'interno del sistema informatico del laboratorio.

Dopo l'accettazione del campione, si passa alla fase del campionamento; la procedura avviene sotto cappa per evitare di inalare i fumi tossici della formalina.

Le biopsie vengono processate per intero, annotando il numero di frammenti rinvenuti e verificandone la corrispondenza sulla richiesta.

Le biocassette vengono poi inserite all'interno dell'isto-processore, un sistema chiuso con all'interno i reagenti necessari per la processazione del tessuto.

Alla fine di questo procedimento il prelievo passerà alla fase successiva: l'inclusione in paraffina, necessaria per creare un supporto solido contenente il pezzo e poterlo così tagliare in sottilissime sezioni utilizzate poi per eseguire l'indagine istologica.

Qualora vi sia un quantitativo di materiale sufficiente si procede già con l'allestimento di campioni per eventuali e successive indagini molecolari.

Spesso le biopsie sono limitate, pertanto non è possibile eseguire un approfondimento per tutti i possibili marcatori.

Per la valutazione delle diverse mutazioni, traslocazioni ed espressioni dei geni presi in considerazione nella valutazione della caratterizzazione molecolare del NSCLC, sono state utilizzate tecniche di biologia molecolare differenti.

- Per lo studio delle mutazioni di *EGFR* è stata utilizzata la metodica di *Real Time PCR* (RT-PCR), mediante l'uso di un pannello relativo alle mutazioni degli esoni 18, 19, 20 e 21.
- Per lo studio del gene *KRAS*, è stata sempre eseguita la tecnica di *RT-PCR*, ed è stata valutata la mutazione a livello del codone G12C, ma negli ultimi casi la metodica è stata aggiornata anche con la ricerca dei codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146.
- Per la mutazione del gene *BRAF* si esegue tecnica *RT-PCR* per la valutazione dell'esone 15 codone 600.
- Per il riarrangiamento di *ALK* viene eseguita la tecnica di *immunoistochimica* (clone D5F3 VENTANA) su piattaforma BenchMark con kit dedicato approvato da FDA e dal Comitato Europeo (FDA-CE) come unico test senza più l'applicazione della conferma in *FISH*.
- Per il riarrangiamento cromosomico di *ROS1* in prima battuta viene eseguita la metodica con *immunoistochimica* (clone ROS1 VENTANA ROS1 – SP384) su strumentazione VENTANA BenchMark e relativo sistema di rivelazione OptiView DAB IHC detection kit. La colorazione dubbia o positiva al test in IHC deve essere sempre confermata dal test in *FISH* per evidenziare la reale traslocazione. Uno studio del 2019 relativo all'utilizzo del clone SP384 ha dimostrato un'eccellente sensibilità senza compromissione della specificità (*Conde Esterh et al., Journal of Thoracic Oncology, Vol.14, No. 12:2120-2132 2019*).
- Per la valutazione dell'iperespressione di *PD-L1* si utilizza tecnica in *immunoistochimica* (clone SP263 ROCHE), che fornisce uno score TPS (Tumor Proportion Score), che corrisponde alla percentuale di cellule positive su un campo di 100 cellule neoplastiche:
 - PD-L1 < di 1%: negativo;
 - PD-L1 tra 1-49%: bassa espressione;
 - PD-L1 ≥ al 50: alta espressione.

10.2 Metodiche per la rilevazione dei target molecolari

a) Immunoistochimica (IHC)

L'immunoistochimica è un metodo altamente specifico, di tipo immunoenzimatico, che sfrutta l'alta affinità antigene-anticorpo per la rilevazione di determinati antigeni presenti nel tessuto o nelle cellule da esaminare, sia in campioni freschi che fissati ed inclusi. Spesso i campioni fissati in formalina necessitano di un pretrattamento (enzimatico o con calore), per rompere i ponti disolfuro creati dalla fissazione, in modo da smascherare i siti antigenici nascosti dal ripiegamento della proteina. Su una sezione di tessuto o su cellule adeguatamente preparate, si pone l'anticorpo specifico (anticorpo primario) per l'antigene che stiamo cercando. Avremo, in questo modo, una reazione antigene-anticorpo che sarà successivamente rivelata da un anticorpo secondario coniugato ad un enzima catalizzatore (ad es. perossidasi) che reagisce con un substrato cromogeno (ad es. DAB marrone, FAST RED rosso) in presenza di H_2O_2 formando così un precipitato insolubile e colorato visibile al microscopio ottico.

- *Metodo diretto*: l'anticorpo primario è legato direttamente alla perossidasi (enzima catalizzatore) che, applicato al tessuto, si legherà specificamente all'antigene. In presenza di H_2O_2 e di un substrato cromogeno la reazione porterà ad un complesso colorato insolubile che precipiterà nel punto di legame antigene-anticorpo permettendo di rivelare la presenza dell'antigene. La tecnica di immunoistochimica diretta è generalmente molto veloce e specifica, ma non molto sensibile quando l'antigene è poco rappresentato (Fig.21).

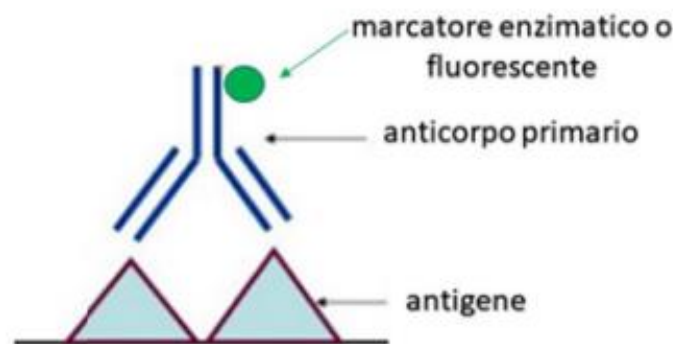


Figura 21: Rappresentazione schematica del metodo diretto.

- *Metodo indiretto*: un anticorpo primario viene fatto reagire con l'antigene eventualmente presente su una sezione di tessuto. Successivamente si aggiunge un anticorpo secondario specifico, coniugato con Biotina. Aggiungendo Avidina coniugata con più molecole di enzima perossidasi questa si lega con grande affinità alla Biotina, creando un complesso ABC. In presenza sempre di H₂O₂ e cromogeno si avrà un precipitato colorato più intenso. Questo metodo è molto più utilizzato, permette di utilizzare anticorpi secondari coniugati con più molecole di enzima che permettono un'amplificazione del segnale, rendendo l'antigene più evidente (Fig.22).

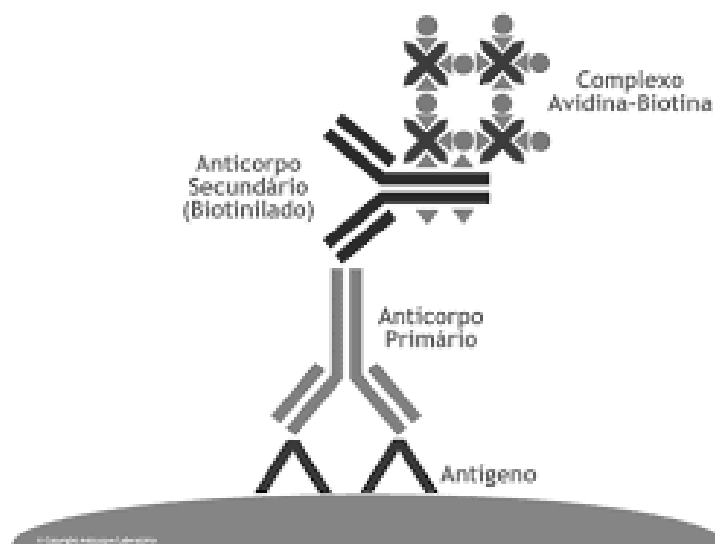


Figura 22: Rappresentazione schematica del metodo indiretto ABC.

Gli anticorpi utilizzati in immunistoichimica possono essere di due tipi:

- monoclonali, più specifici e meno sensibili
- policlonali, meno specifici e più sensibili

Questa tecnica ha subito una profonda evoluzione metodologica, permettendo di sorpassare le metodiche di immunofluorescenza.

Per l'analisi immunistoichimica utilizziamo vetrini polarizzati di sezioni bianche di dimensioni di 2-4 μ , passati in stufa a 56°C per rompere i legami che la paraffina crea con il tessuto.

Attualmente per questo test si utilizza una processazione automatizzata su strumentazione Ventana-BenchMark utilizzando kit di rivelazione ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana-Roche) (Fig.23).

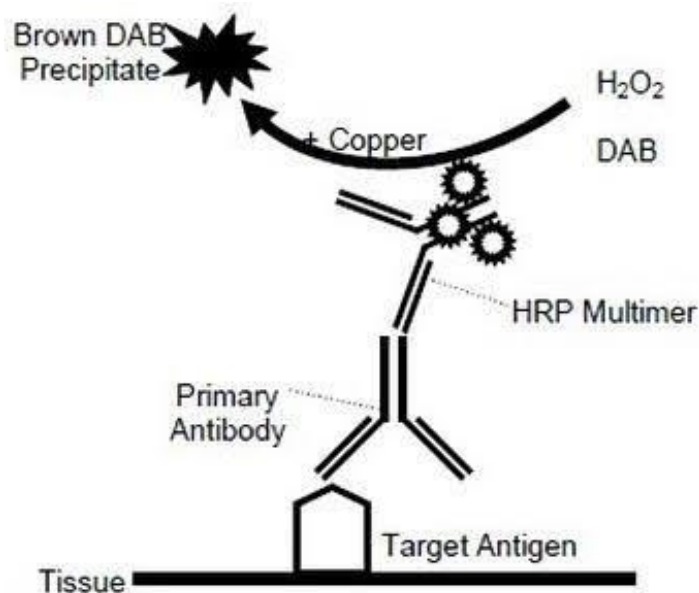


Figura 23: UltraView Universal DAB Detection Kit rileva mAb' o rAb' legati ad un antigene in sezioni di tessuto in paraffina. Un cocktail di anticorpi secondari marcati con una catena di enzimi perossidasi localizza l'anticorpo specifico. Questo complesso viene visualizzato con l'incubazione di DAB + H₂O₂ che in presenza di enzima perossidasi da un precipitato marrone.

I vetrini con le sezioni di tessuto da cimentare vengono inseriti nell'apparecchiatura siglati con un "barcode" che corrisponde ad un determinato test immunohistochimico: antigene da rilevare, anticorpo, tipo e intensità di smascheramento, durata di incubazione. Tutto il processo, a seconda del tipo di anticorpo, avrà durata diversa.

Alla fine della processazione il vetrino viene contro-colorato in ematossilina, montato con copri-oggetto ed analizzato al microscopio ottico.

Nelle figure 25, 26 esempi di marcatura in IHC per ROS1; nelle figure 27, 28 marcatura per PD-L1 e in figura 29 per ALK.

È riportato in letteratura che il pattern di espressione di ROS1 in IHC può presentarsi più o meno citoplasmatico o di membrana a seconda del partner di

fusione con ROS1 (*Yoshida A., Kohno T., Tsuta K., et al. ROS1-rearranged lung cancer: a clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases. Am J Surg Pathol. 2013;37(4):554-562*).



Figura 24: Strumentazione **Bench-Mark**: è uno strumento automatico utilizzato per immunohistochimica nel quale i vetrini vengono alloggiati in appositi cassette. Ogni vetrino possiede un codice a barre differente. Compito di questo strumento è leggere quale programma e quale anticorpo dovranno essere applicati a quel determinato vetrino. Anticorpi e sistema di rivelazione sono posti in siringhe all'interno dello strumento stesso. Allo strumento è collegato un computer con il quale vengono poi programmati i protocolli da eseguire su quel campione tramite lettura del codice a barre posto sul vetrino.

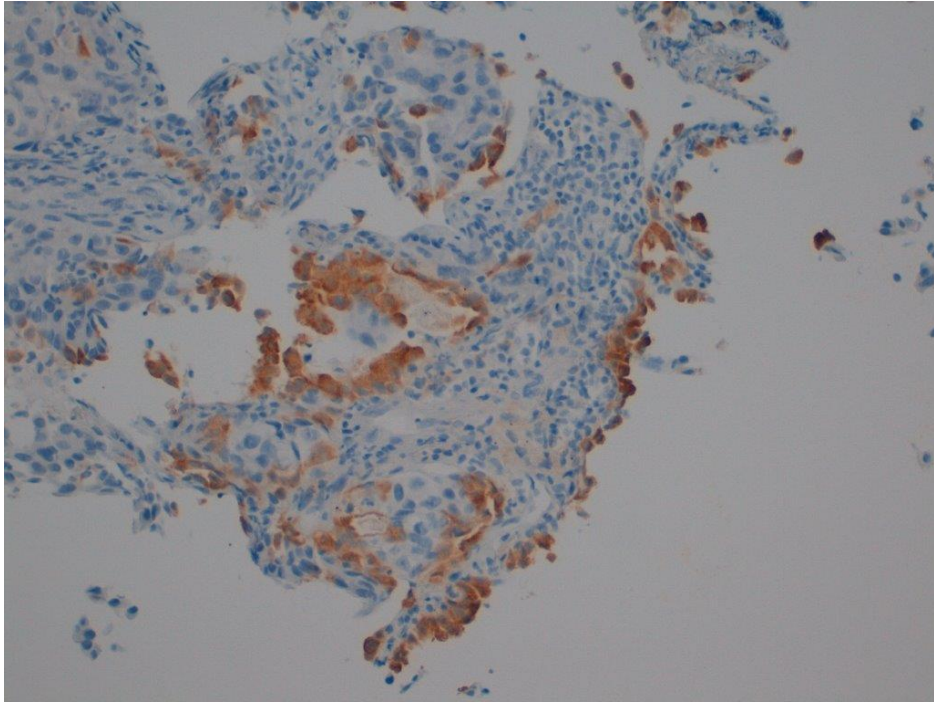


Figura 25: Marcatura eterogenea di ROS1 (dubbia: non in tutti gli elementi e di diversa intensità) in IHC in un caso di ADC, ingrandimento 20x.

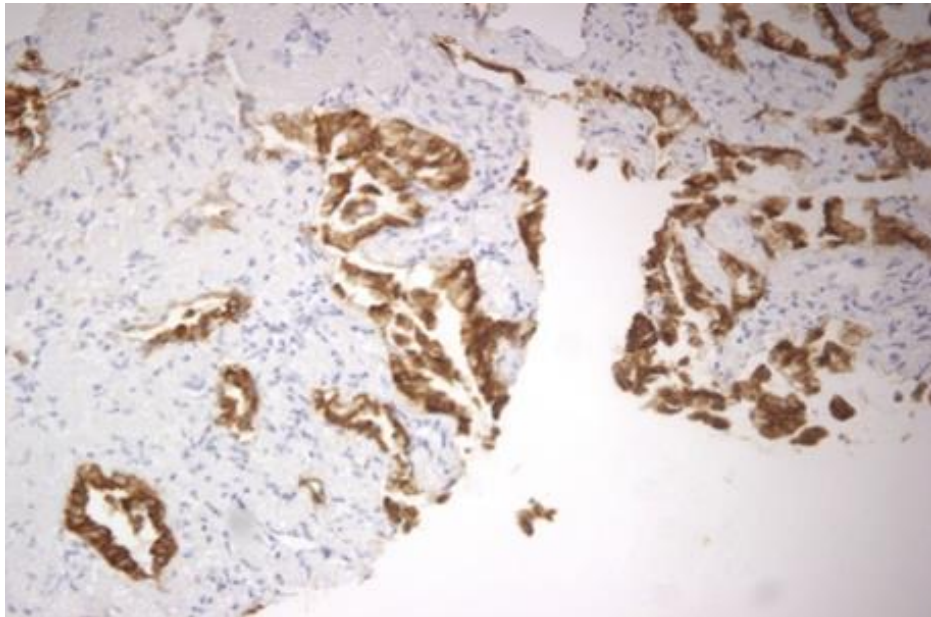


Figura 26: Marcatura di ROS1 positiva (intensa colorazione in quasi tutti gli elementi neoplastici) in IHC in ADC, ingrandimento 10x.

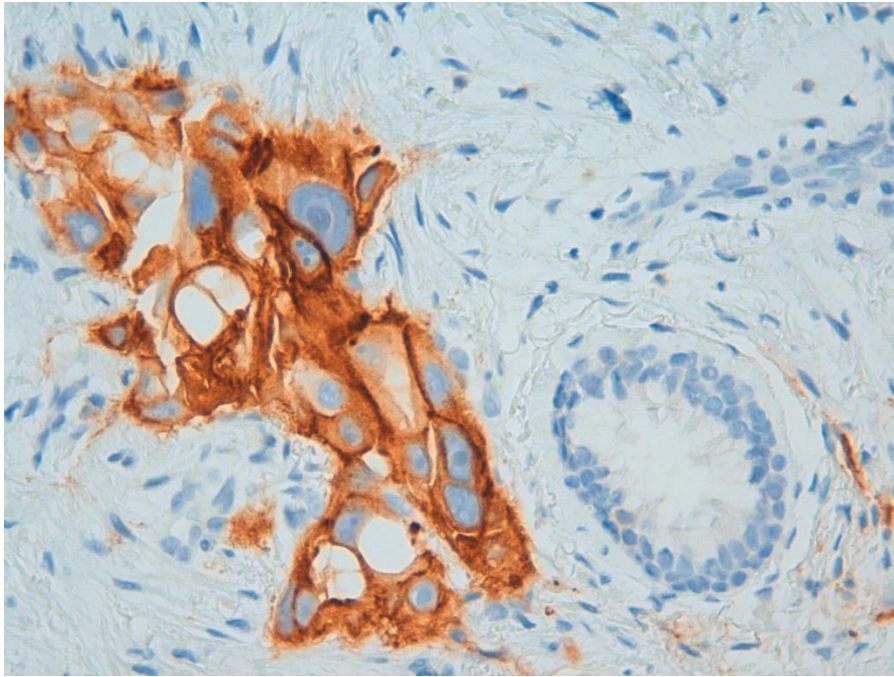


Figura 27: Intensa marcatura di membrana di PD-L1 in IHC nella maggior parte degli elementi neoplastici. TPS 70% alta espressione, ingrandimento 40x.

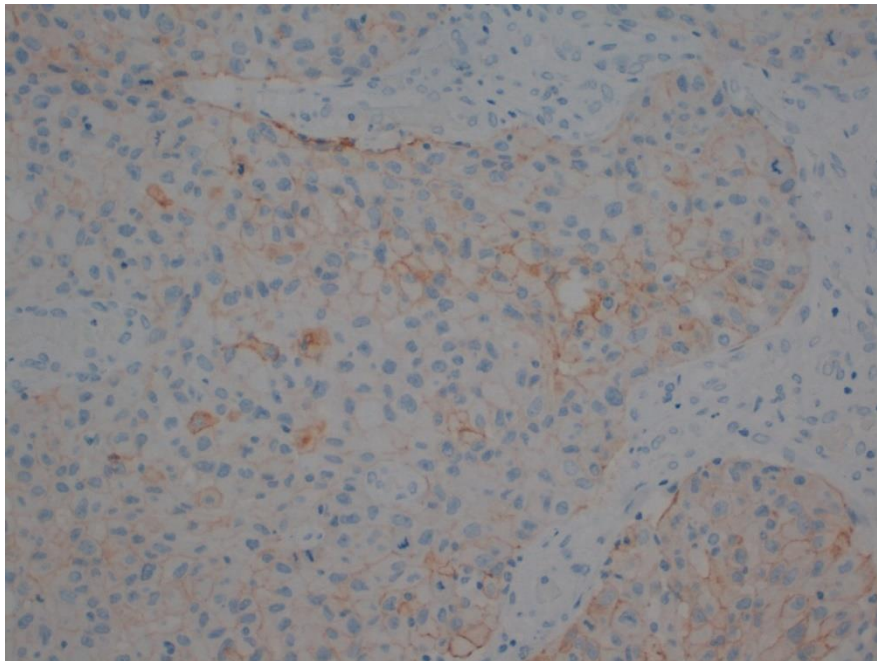


Figura 28: Debole marcatura di membrana di PD-L1 in IHC in parte degli elementi neoplastici. TPS 30% bassa espressione, ingrandimento 30x.

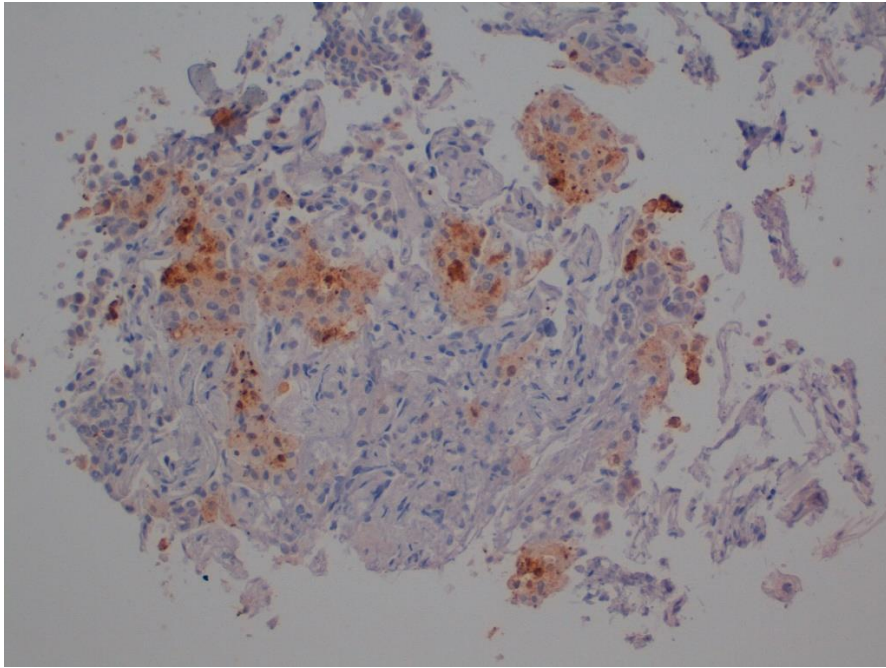


Figura 29: Intensa e moderata marcatura citoplasmatica di ALK in IHC in gran parte degli elementi neoplastici, positività eterogenea, ingrandimento 20x.

Nonostante la maggior parte dei casi di NSCLC possa essere tipizzata in base all'esame isto-morfologico tramite l'uso della colorazione ematossilina-eosina, l'accurata classificazione di un tumore può essere complicata.

Questa condizione può essere indotta da carenza di cellule tumorali vitali o per esempio da zone di necrosi estese, oppure il campione bioptico può avere una carenza a livello cellulare e pertanto viene a mancare l'architettura tipica della neoplasia in questione.

In questi casi il ruolo della IHC gioca un ruolo cruciale nella determinazione del sottotipo tumorale.

I marcatori più usati nella classificazione del NSCLC con IHC sono:

- TTF-1 (clone SP141)
- Napsina A (clone MRQ-60)
- Citocheratina 5- CK5 (clone D5/16B4)
- P63 (clone 4A4)
- P40 (clone BC28)

Studi hanno dimostrato, che per aumentare l'efficienza e l'accuratezza dell'esame IHC nella sottoclasse del NSCLC, il connubio di diversi marcatori in IHC è fondamentale per l'ottenimento di una buona diagnosi. La combinazione di Napsina A, TTF-1 e P40 sembrerebbe aumentare sia la sensibilità (74%) sia la specificità (87%) nell'identificazione di ADC (Ao, Ming-Hui, et al. *"The utility of a novel triplemarker (combination of TTF1, napsin A, and p40) in the subclassification of non-small cell lung cancer."* *Human pathology* 45.5 (2014): 926-934.), al contrario la

combinazione di P63 e CK5 ha dimostrato sensibilità del 100% e specificità pari al 92% nell'identificazione del tumore SQ.

Inoltre, l'azione combinata di più markers per lo studio IHC permette di conservare campione per ulteriori accertamenti molecolari fondamentali per la personalizzazione della terapia.

Ad oggi però l'approccio più applicato nella diagnosi dell'ADC è l'utilizzo del marker TTF-1 e P63 per l'indagine di carcinoma SQ (*Diagnosi of NSCLC in small biopsies and cytology: implication of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer, 137 (5), 668,-684, Travis W.D e coll., 2011).*

b) Ibridazione Fluorescente in Situ (**FISH**)

L'ibridazione Fluorescente in Situ è un tipo particolare di ibridazione:

- fluorescente, perché impiega frammenti di sequenze di DNA (sonde) marcati con molecole fluorescenti (fluorocromi),
- in situ, perché applicata ad un DNA genomico di una sezione di tessuto o striscio cellulare, fissato e montato su un vetrino portaoggetti.

Questa tecnica si basa sulla proprietà del DNA di denaturarsi in modo reversibile (apertura della doppia elica) e sfrutta il principio per cui una qualunque sequenza di DNA è capace di legarsi alla sua sequenza complementare.

Ciò prevede il legame tra un frammento di DNA specifico per la regione di interesse (sonda) e la sequenza di DNA complementare del campione.

Quando si riportano le condizioni fisiche di rinaturazione del DNA la sequenza sonda, ibridata al DNA genomico, rimane fissata al preparato.

Le sonde FISH vengono marcate con una marcatura diretta, in cui si forma un legame covalente tra i nucleotidi della sonda e un colore fluorescente, si possono preparare più sonde diverse fra loro e identificabili se coniugate ognuna con fluorocromi differenti. In questo modo si possono effettuare ibridazioni in situ con più sonde contemporaneamente, visualizzando la presenza delle sequenze bersaglio di interesse all'interno di uno stesso nucleo.

Diversi sono i tipi di sonde che si possono utilizzare (Fig. 30):

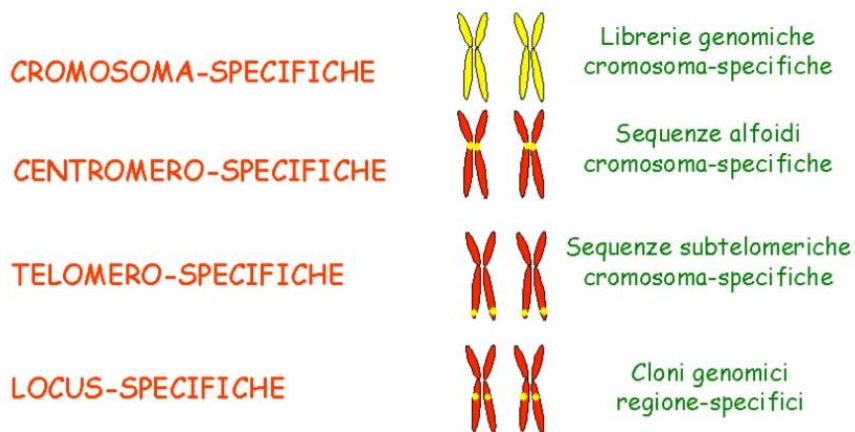


Figura 30: Schema riassuntivo dei tipi di sonda utilizzabili nella tecnica FISH.

L'utilizzo di sonde cromosoma specifiche permette di determinare il numero di copie di un dato cromosoma, o regioni traslocate, presente all'interno del nucleo, allo stesso modo sonde locus specifiche rilevano la presenza di geni o parti di essi, amplificati o deleti in un nucleo. L'utilizzo di fluorocromi differenti consente di marcare le sonde specifiche, rendendo possibile la visualizzazione simultanea di bersagli cromosomici differenti nello stesso nucleo.

La versatilità di questa tecnica consente un'applicazione diagnostica in innumerevoli campi: nella diagnosi prenatale, nella diagnosi di sindromi cromosomiche, nei mosaicismi e nel monitoraggio alla risposta terapeutica dei tumori.

L'ibridazione in situ fluorescente prevede diversi steps (Fig.31):

- scelta di una sequenza nota di DNA (sonda) marcata con un fluorocromo;
- allestimento dei campioni da studiare;
- denaturazione del DNA genomico e della sonda mediante innalzamento della temperatura a 75°C per 10' e poi incubazione a 37°C over-night;
- ibridazione del DNA dei campioni con il DNA sonda;
- rinaturazione del DNA con l'eventuale legame della sonda mediante abbassamento della temperatura;
- lavaggi di stringenza per eliminare legami sonda-DNA genomico non specifici;
- contro-colorazione con DAPI (molecola fluorescente che si intercala in maniera aspecifica al DNA) per evidenziare i singoli nuclei;
- osservazione dei campioni con microscopio a fluorescenza.

La denaturazione del DNA, sia della sonda che quello cellulare, si ottiene con innalzamento della temperatura e/o con agenti denaturanti.

L'impiego di agenti denaturanti permette di operare a temperature più basse, tali però da non interferire con la rinaturazione del DNA al riabbassarsi della temperatura.

La miscela in cui sono conservate le sonde è studiata e preparata dalle ditte fornitrici per cui ogni casa produttrice fornisce un esempio di protocollo da seguire.

Nel nostro laboratorio viene utilizzata la sonda SPEC ROS1 Dual Color Break Apart Probe (ZytoVisoon) e relativo kit di pretrattamento dedicato per la rilevazione qualitativa delle traslocazioni che coinvolgono il gene umano ROS1 nella regione 6q22.1. I campioni da cimentare, fissati in formalina e inclusi in paraffina, sono tagliati in sezioni dello spessore di 4-6 μ e posti su vetrini polarizzati (Fig.32).

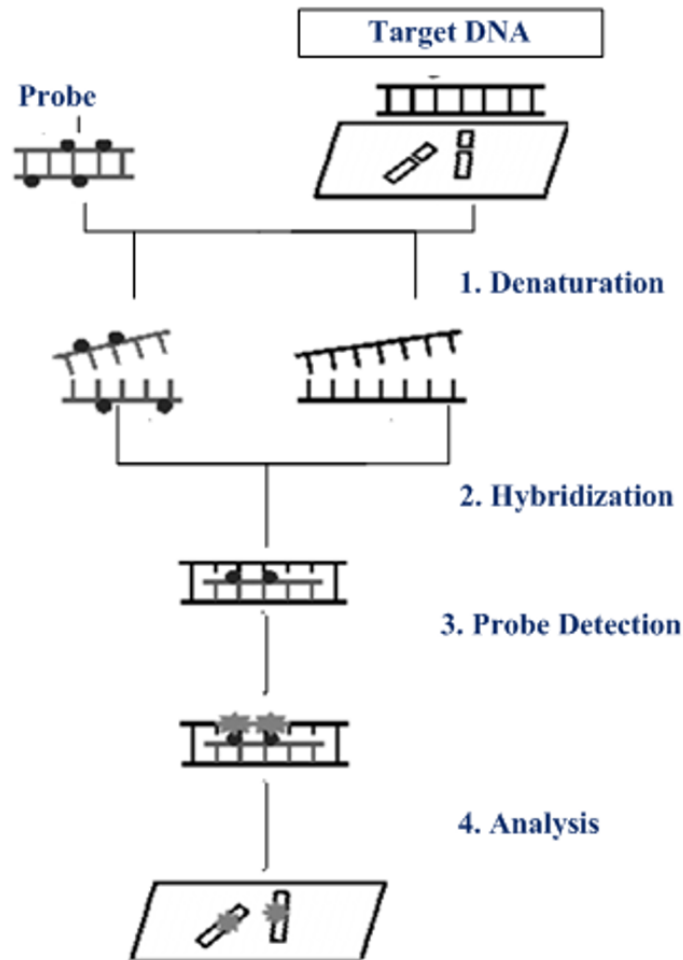


Figura 31: Passaggi della tecnica di ibridazione in situ.

PROTOCOLLO ROS1

SEZIONI O.N. A 56°C IN TOP BRITE

DEPARAFFINIZZAZIONE: XILOLO rt x30' X 3

ALCOOL 100 rt X 2

ALCOOL 95

ALCOOL 75

H2O

PRETRATTAMENTO: HEAT PRETREATMENT SOLUTION CITRIC 95°C X 16'-17'

H2O

PEPSINA: PEPSIN SOLUTION (pronta all'uso) 37 °C X 15'

LAVAGGIO: SSC (pronto all'uso) rt 1-2'

H2O

POST FISSAZIONE: FORMALINA 10% rt 10'

SSC

H2O

ALCOOL 70 rt

ALCOOL 95

ALCOOL 100

ASCIUGARE ALL'ARIA

SONDA ROS1

Coprire con coprioggetto, sigillare con mastice, in **Top Brite programma ROS1** (75 °C x 10' – 37°C ON)

LAVAGGI POST IBRIDAZIONE: WASH A 1X (diluire WASH 25X) in 3 vaschette a 37°C

WASH A 37°C per smontare vetrini

WASH A 37°C 5'

WASH A 37°C 5'

ALCOOL 70 rt

ALCOOL 95

ALCOOL 100

ASCIUGARE ALL'ARIA

DAPI

Coprioggetto, sigillare, 15' a riposo a 4°C

Figura 32: Protocollo FISH per ROS1.

I campioni così ottenuti vengono visionati al microscopio a fluorescenza (Leica DM6000B) con filtro a doppia banda Green/Orange e le immagini acquisite con un analizzatore di immagine semi automatico (CytoVision Leica) (Fig. 33).

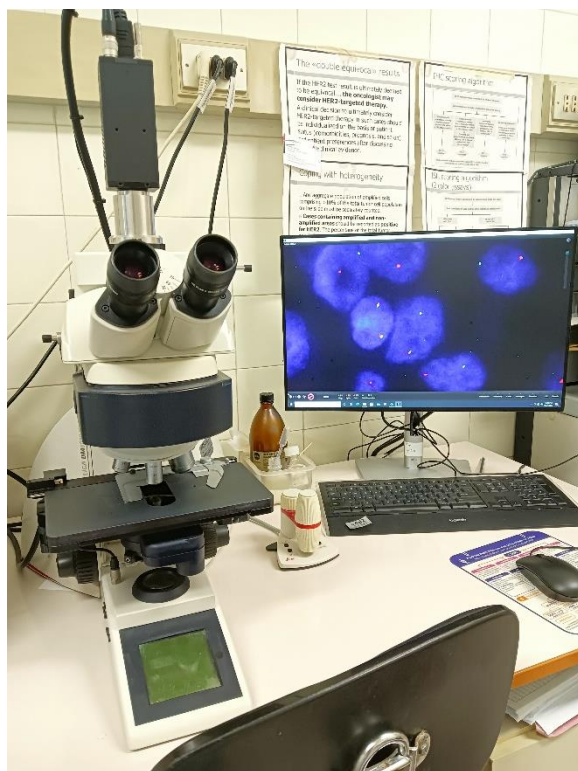


Figura 33: Microscopio a fluorescenza.

I riarrangiamenti di ROS1 definiscono un sottogruppo molecolare di NSCLC con caratteristiche cliniche distinte; pertanto, l'utilizzo della FISH è uno strumento utile per l'identificazione di pazienti che potrebbero rispondere alle terapie che hanno come bersaglio ROS1.

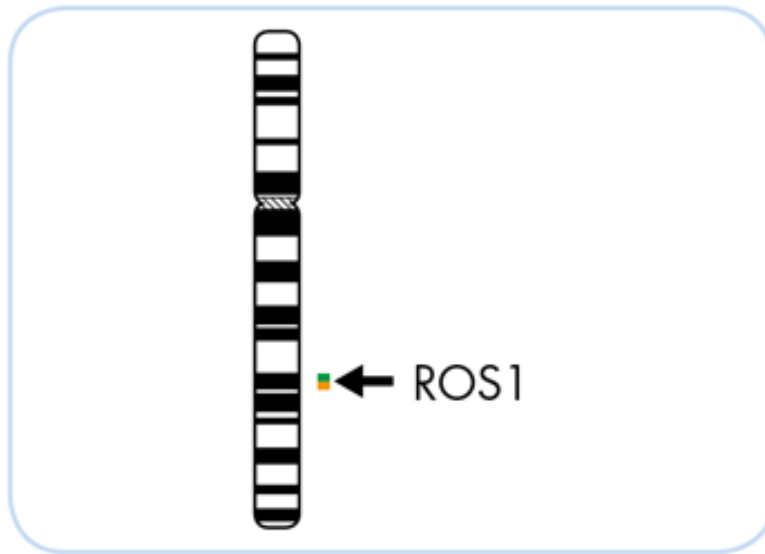


Figura 34: Locus ROS1 nel cromosoma 6.

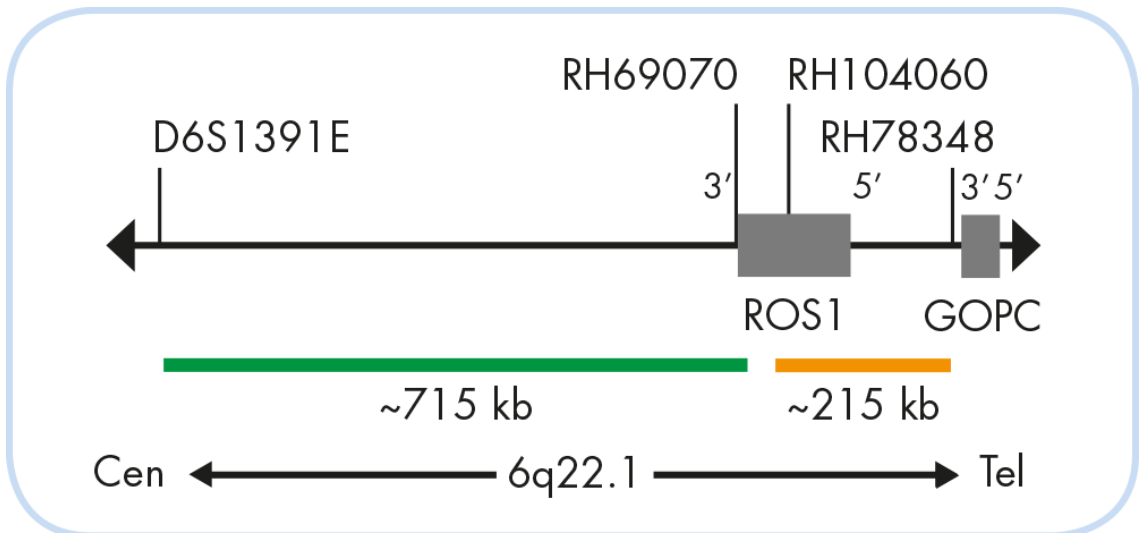


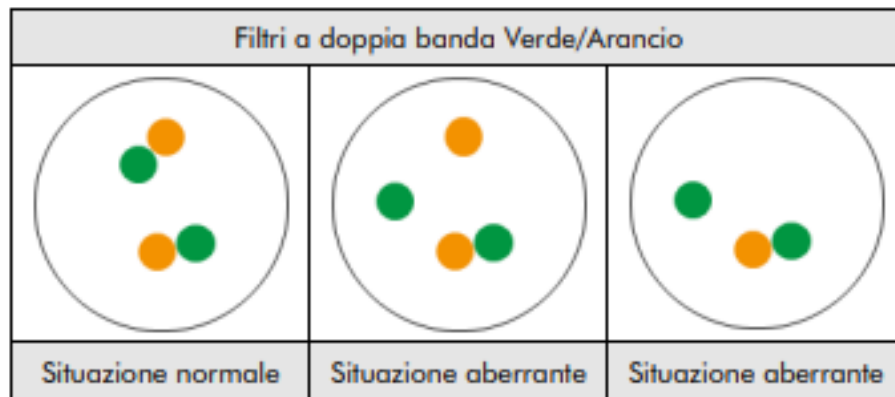
Figura 35: Mappa della sonda SPEC ROS1.

La miscela è costituita da due sonde complementari al DNA, la sonda marcata con fluorocromo ORANGE (ecc. 547 nm/em. 572 nm) riconosce la sequenza genomica all'estremità 5'(telomerica) del punto di rottura, mentre l'altra sonda marcata con fluorocromo GREEN (ecc. 503 nm/em. 528 nm) riconosce la sequenza genomica all'estremità 3'(centromerica) del punto di rottura di fusione (Fig. 35).

Poiché il dominio tirosin-chinasico di ROS1 è codificato dalla parte 3' del gene, un segnale spaiato dalla parte 3' del gene (GREEN) rileva la fusione del gene, mentre

un segnale spaiato al 5' del gene (ORANGE) rappresenta un probabile prodotto non funzionale.

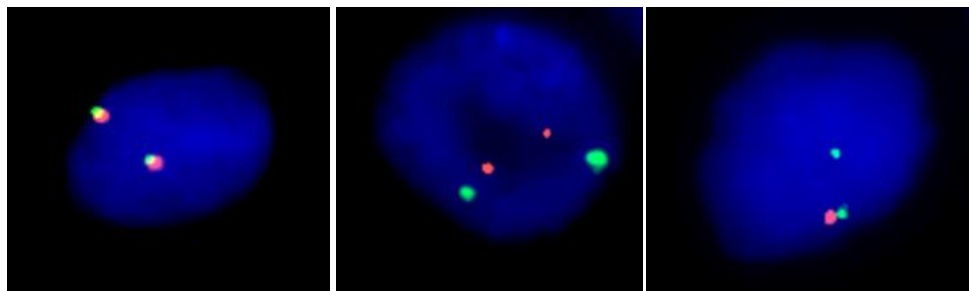
Per cui cellule con un segnale isolato 3'(GREEN) sono considerate come cellule con riarrangiamento positivo, al contrario cellule con un segnale isolato 5'(ORANGE) non sono da interpretarsi come cellule con riarrangiamento positivo.



A

B

C



Situazione normale

Situazione aberrante

Situazione aberrante

A

B

C

Figura 36: Risultati attesi in situazione normale e aberrante.

- **A:** *situazione normale*, i due segnali Orange/Green risultano molto vicini tra loro, indice di assenza di traslocazione del gene ROS1; spesso i segnali sovrapposti possono apparire di colore giallo;
- **B:** *situazione aberrante*, i due segnali Orange/Green risultano separati uno rispetto all'altro, indice di traslocazione del gene ROS1;

- **C: situazione aberrante**, un segnale 3' (GREEN) isolato è il risultato di un riarrangiamento positivo per traslocazione della porzione codificante il dominio tirosin-chinasico.

La valutazione della distanza, tra i due segnali Orange e Green, affinché si possa considerare la presenza di una traslocazione (split), deve essere più lunga del diametro del segnale più grande (*IASLC Atlas of ALK and ROS1 testing in Lung Cancer, Ming Sound Tsao et al. 2018*).

Per la validazione del test devono essere visionate almeno 50 cellule neoplastiche per campione e valutare la % di cellule positive:

$$\frac{n^{\circ} \text{ cellule con split} + n^{\circ} \text{ cellule con un segnale green isolato}}{n^{\circ} \text{ cellule totali valutate}}$$

Nel nostro Laboratorio sono state valutate una media di 300 cellule neoplastiche per campione con un cut-off di valutazione:

- *positivo*: $\geq 15\%$ dei nuclei neoplastici con riarrangiamento;
- *negativo*: $< 15\%$ dei nuclei neoplastici con riarrangiamento;

(Shaw AT et al. Crizotinib in ROS1 – rearranged non-small-cell lung cancer: a review with recommendations. Virchows Arch (2016) 469:489-503), (Lindeman NI, et al. Updated Molecular Testing GuidLine for the Selection of NSCLC Patients for treatment with targetef tyrosine kinase inhibitors: guideline from the Collage of American Pathologist, the international association for the study of Lung Cancer, and the association for Molecular Pathology Arch Pathol Lab Med. 2018 Mar,142(3):321-346).

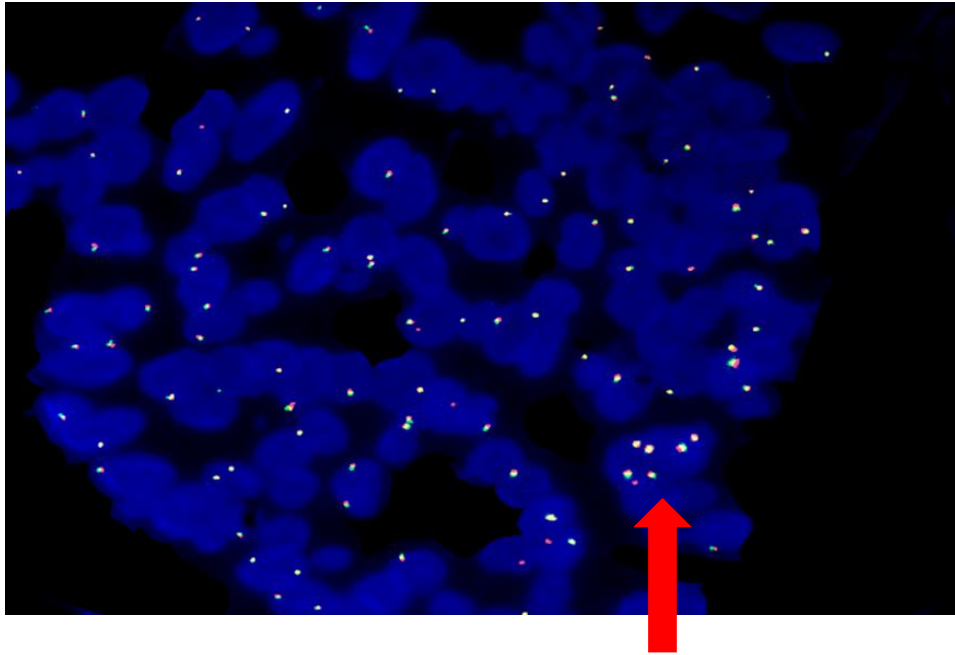


Figura 37: ROS1 in metodica FISH non traslocato.

I due segnali Orange e Green sono molto vicini, quasi sovrapposti, si fondono in un unico segnale giallo, indice che il gene non è traslocato.

È visibile FISH di ROS1 senza evidenza di traslocazione, da tessuto incluso in paraffina, di un caso di NSCLC con positività dubbia per ROS1 in IHC.

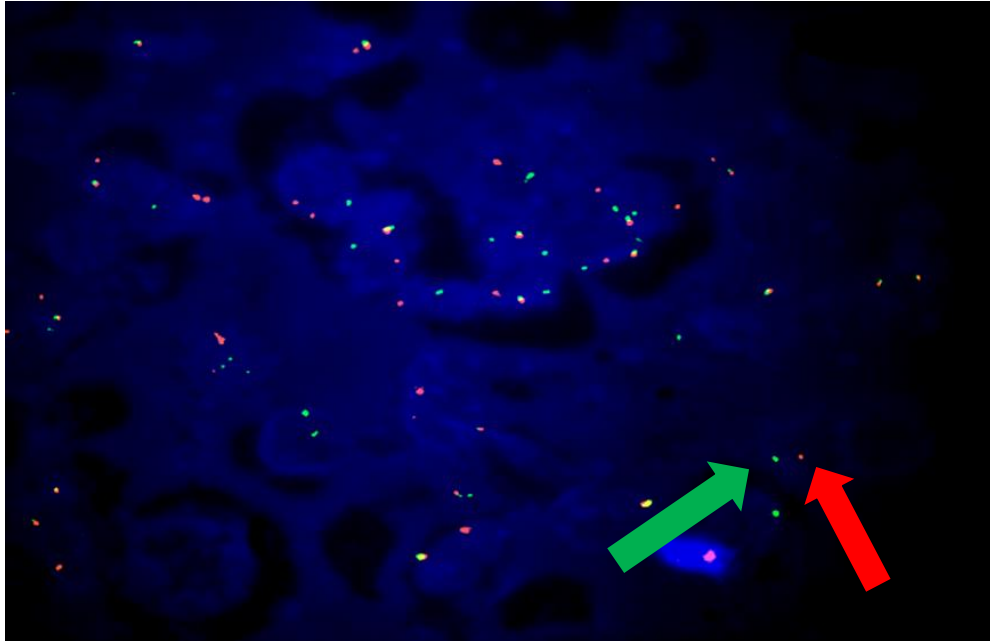


Figura 38: ROS1 in metodica FISH traslocato.

Le due sonde sono distanziate l'una dall'altra, questo ci permette di confermare la traslocazione del gene.

È visibile FISH di ROS1 con evidente traslocazione a conferma della positività per ROS1 rilevata in IHC, da tessuto incluso in paraffina, di un caso di NSCLC.

La tecnica FISH, ad oggi, è universalmente accettata come standard di riferimento in quei casi dubbi o positivi in IHC per il gene ROS1.

Inizialmente, così come per ROS1, la valutazione e la convalida del riarrangiamento del gene ALK veniva effettuata mediante utilizzo della FISH per selezionare poi i pazienti da trattare con inibitori di ALK (Crizotinib).

Nel 2015, l'espressione della proteina ALK mediante tecnica IHC è stata approvata dall'FDA come unico strumento diagnostico.

La più grande limitazione nell'utilizzo della IHC e della FISH è l'assenza di completa standardizzazione.

Infatti, in letteratura già dal 2012 viene descritta la possibilità di ottenimento di falsi-negativi con entrambe le tecniche.

La ragione per cui è possibile la presenza di falsi-negativi è correlata alla scarsità di cellule tumorali presenti nei campioni (*McLeer-Florin A., Moro-Sibilot D., Melis A., et al: Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in NSCLC in a routine practice: a French study. J Thorac Oncol. 2012;7(2):348-354*).

In alcuni casi il riarrangiamento della parte 3' di ROS1 (green) con un partner di fusione localizzato sul cromosoma 6, poco distante dal locus ROS1, potrebbe portare a non identificare uno split con la parte 5' di ROS1 (red).

Al contrario, i risultati falsi-positivi del test FISH sono molto spesso dovuti a schemi atipici, come segnali di fusione multipla e segnali verdi solitari con traslocazione centromerica 5', interpretati erroneamente come positivi (*Cutz JC, Craddock KJ, Torlakovic E., et al., Canadian anaplastic lymphoma kinase study: a model for multicenter standardization and optimization of ALK testing in lung cancer. J Thorac Oncol. 2014; 9:1255-1263*).

Diversi gruppi di ricerca hanno proposto un nuovo algoritmo diagnostico per la valutazione di possibili riarrangiamenti di ALK e ROS1 (Fig.39).

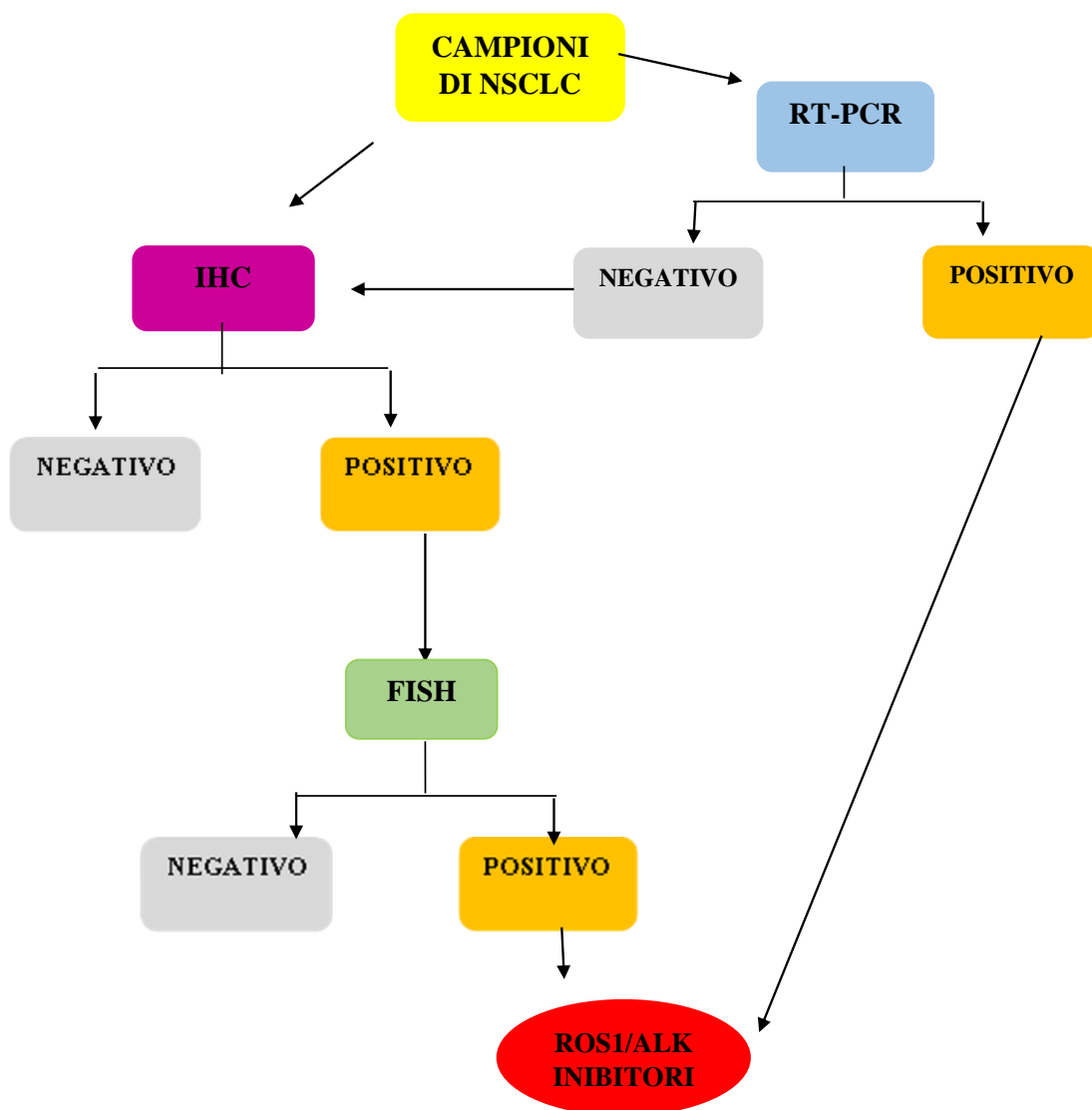


Figura 39: Algoritmo, per la valutazione dei riarrangiamenti ROS1-ALK, proposto da *Japanese Lung Cancer Society*, che prevede tecniche di IHC e conferma in FISH; RT-PCR usata invece, ove possibile, superando un doppio step diagnostico, con buona affidabilità e velocità di diagnosi.

In un futuro prossimo si sta elaborando l'idea di fare affidamento su un ulteriore esame di conferma mediante RT-PCR, in particolar modo nei casi con score 2+ in IHC e FISH negativa (algoritmo in fase di studio) (*Yatabe Y., ALK FISH and IHC: you cannot have one with-out the other. J Thorac Oncol.2015;10:548-550*).

c) Real-Time PCR (**RT-PCR**)

La reazione a catena della polimerasi in tempo reale è una metodica che permette di amplificare una sequenza specifica di DNA milioni di volte.

Paragonata alla PCR tradizionale semi quantitativa, il test non solo è altamente sensibile, ma allo stesso tempo garantisce una maggiore specificità e precisione per la quantificazione di un campione ignoto.

In questa tecnica vengono usate sonde marcate con fluorocromi che emettono segnali fluorescenti direttamente proporzionali alla quantità di DNA di interesse presente nel campione.

I reporter fluorescenti emettono luce visibile solo quando si associano con l'amplicone della sequenza target, per cui le variazioni nelle fluorescenze emesse rappresentano un'espressione diretta della quantità di prodotto formato, permettendo di quantificare tramite software specifici il numero di molecole di DNA target presenti nel campione, anche se in piccola quantità.

Durante i primi cicli di reazione, il segnale di fluorescenza è debole in quanto il prodotto amplificato è a bassa concentrazione e non può essere ancora distinto dal segnale di fondo (background o baseline). Con l'aumentare dei cicli di amplificazione il prodotto inizia ad aumentare rapidamente sviluppando un segnale di fluorescenza che cresce in maniera esponenziale (fase esponenziale), per poi saturarsi in fase di plateau, seguendo la medesima cinetica descritta per la PCR tradizionale (Fig.40).

Il numero di cicli utili per raggiungere un'intensità di fluorescenza che supera la linea di base (baseline) è detto ciclo soglia Ct (threshold cycle, Ct), e corrisponde ad un numero intero o frazionario, tanto maggiore quanto minore è la quantità di target presente nel campione in analisi.

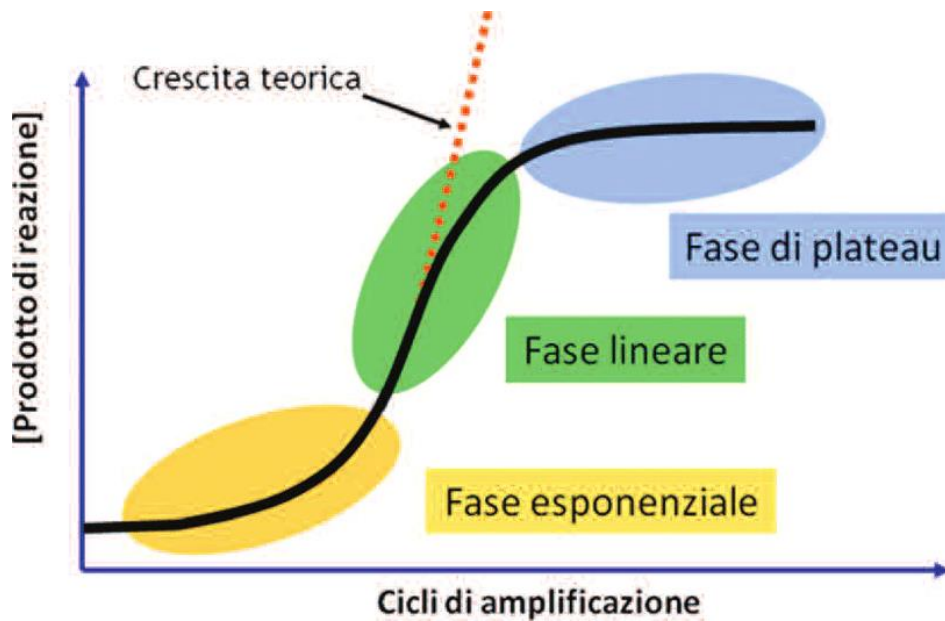


Figura 40: Rappresentazione schematica dell'andamento esponenziale di una tipica reazione i RT-PCR.

La RT-PCR prevede l'utilizzo di primers specifici, di quattro nucleotidi liberi (dNTPs), della DNA polimerasi termoresistente (Taq Polimerasi ottenuta dal batterio *Thermus Aquaticus*) e di un buffer di reazione nel quale sono presenti ioni, necessari per la determinazione dell'ambiente idoneo alla reazione.

La prima fase della reazione prevede la denaturazione del campione di DNA ad una temperatura compresa tra 94°C - 98°C per 30 secondi.

La successiva fase di annealing prevede una riduzione della temperatura fino a 50°C per circa 30-40 secondi: in questa fase avviene il legame dei primers specifici con il filamento complementare.

La terza fase è quella di estensione in cui l'enzima Taq Polimerasi ad una temperatura compresa tra i 75°C - 80°C sintetizza il nuovo filamento di DNA complementare.

Queste tre fasi si ripetono per 30-40 cicli a seconda dei geni da amplificare. Importante è il mantenimento e la regolazione delle differenti temperature nelle diverse fasi di reazione, poiché temperature troppo basse darebbero luogo a prodotti aspecifici, mentre temperature troppo elevate ostacolerebbero i legami ai filamenti di DNA.

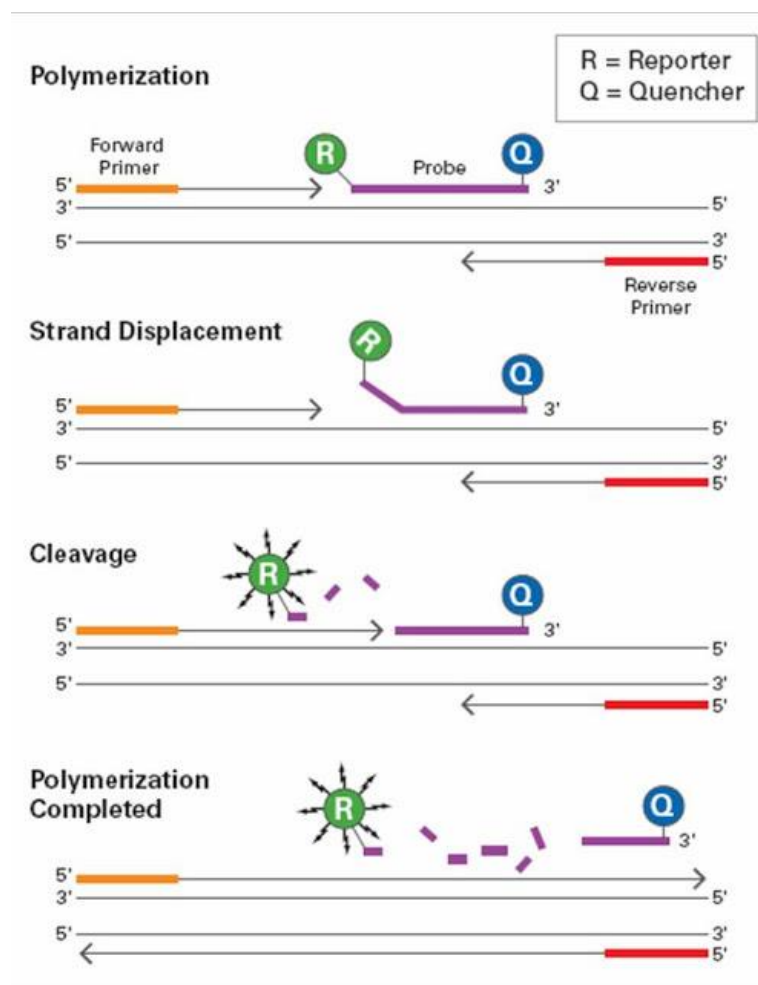


Figura 41: Funzionamento di una sonda TaqMan.

I sistemi per Real-Time PCR sono stati aggiornati con l'introduzione delle sonde di idrolisi poiché queste hanno reso possibile il rilevamento dei soli prodotti di amplificazione di interesse.

Le sonde idrolitiche sono dotate, alle due estremità, di un fluoroforo ad alta energia, reporter, e di un inibitore del fluoroforo, quencher. Quando la sonda è appaiata alla sequenza bersaglio, l'inibitore è sufficientemente vicino al fluoroforo da bloccarne l'emissione del segnale fluorescente.

Durante l'allungamento, in ogni ciclo di amplificazione, la polimerasi idrolizza la sonda. In questo modo il fluoroforo viene liberato nella miscela di reazione e si allontana dall'azione dell'inibitore, con conseguente emissione del segnale fluorescente.

Pertanto, nelle analisi in cui si utilizzano sonde idrolitiche l'emissione del segnale fluorescente dipende dall'attività della Taq DNA polimerasi.

Nel Laboratorio di Anatomia Patologica dell'ASL2 di Savona i campioni vengono processati e analizzati mediante piattaforma RT-PCR per la valutazione di possibili mutazioni dei geni EGFR, BRAF e KRAS.

La piattaforma in uso è EasyPGX CE IVD, che permette di ottenere risultati in meno di 3 ore.

Il materiale di partenza è il tessuto tumorale, che può essere fresco, congelato, FFPE (fissato in formalina e incluso in paraffina) o plasma. La piattaforma prevede l'applicazione della Real Time PCR per rilevazione di DNA mutato.

Si parla di un processo automatizzato con utilizzo di kit specifici per l'estrazione del DNA da tessuto.

L'intera procedura, per la ricerca del DNA tumorale mutato, è data da quattro fasi sequenziali (Fig. 42):

- 1) lisi del tessuto tumorale ed estrazione del DNA
- 2) configurazione real-time PCR
- 3) corsa RT-PCR, che permette di utilizzare lo stesso profilo termico per tutti i bersagli, fornendo quindi la possibilità di eseguire più bersagli in una unica analisi
- 4) analisi dei dati mediante Easy Analysis Software.

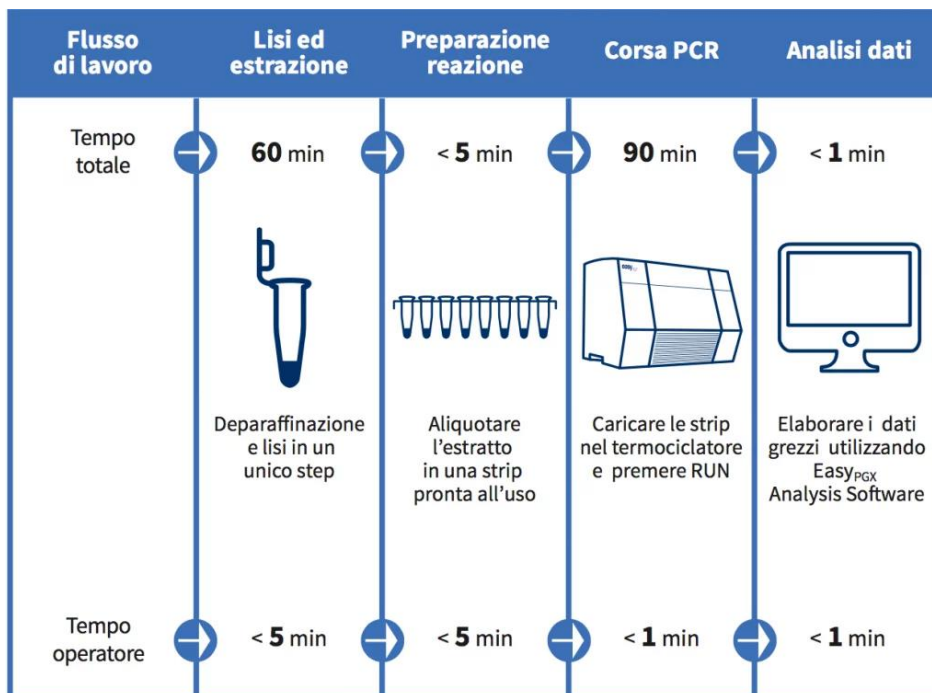


Figura 42: Processazione campioni di DNA tumorale in RT-PCR per la valutazione del profilo mutazionale.

Questa piattaforma di ultima generazione presenta una serie di vantaggi:

- reagenti pronti all'uso;
- facile manipolazione;
- flessibilità del campione richiesto con basso quantitativo di materiale proveniente da diverse fonti, inclusi FFPE e plasma;
- limitate possibilità di contaminazione del DNA da analizzare;
- alta sensibilità;
- tempi di consegna ridotti.

Applicazione RT-PCR per la rilevazione di mutazioni in NSCLC:

a) Kit BRAF

Il kit “EasyPGX ready BRAF” è costituito da strip di 8 provette da 0.2 ml precaricate con tutto il necessario per l’esecuzione del test in formato anidro, stabile e conservato a temperatura ambiente. Inoltre le provette contengono i reagenti per l’estrazione del DNA da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE).

Il kit “EasyPGX ready BRAF” amplifica selettivamente il DNA mutato in campioni contenenti una miscela di DNA mutato e wild type.

Il rilevamento avviene attraverso sonde fluorescenti marcate con FAM (per il rilevamento del target) ed HEX (per il rilevamento di un gene di controllo interno).

In ogni reazione viene testato un controllo interno, un controllo positivo e un controllo negativo, che vengono forniti dal kit.

L’amplificazione del gene di controllo interno consente di verificare la corretta esecuzione della procedura di amplificazione e l’eventuale presenza di inibitori, che possono causare dei risultati falsamente negativi.

b) Kit EGFR

Il kit “EasyPGX ready EGFR” plus è composto da 8 provette da 0.2 ml precaricate con tutti i reagenti necessari per la processazione dei campioni. Il kit per il gene EGFR consente di amplificare selettivamente il DNA mutato (esoni 18,19,20 3 21) in quei campioni contenenti una miscela di DNA mutato e wild-type.

Il rilevamento delle principali mutazioni, inserzioni e delezioni avviene mediante 8 miscele di primers specifiche.

EasyPGX ready EGFR plus attualmente risulta essere l’unico kit completo per uso diagnostico in vitro, che permette anche il rilevamento delle mutazioni secondarie acquisite, T790M.

c) *Kit KRAS*

Il kit “EasyPGX ready KRAS” è composto da 8 provette da 0.2 ml precaricate con tutto il necessario per l’esecuzione del test, che permette di rilevare le principali mutazioni dell’esone 2 (codone 12,13), dell’esone 3(codone 59, 61) dell’esone 4 (codone 117, 146) del gene KRAS mediante 8 miscele di oligonucleotidi.

Il materiale di partenza può essere DNA isolato da tessuto tumorale sia fresco, sia congelato che FFPE. Permette di ottenere, non soltanto l’analisi mutazionale dei codoni 12, 13, 59, 61, 117 e 146, ma consente anche di discriminare la variante G12C, utile per la selezione di quei pazienti trattabili con inibitori di KRAS G12C.

11. RISULTATI

Dei 133 casi analizzati (59 donne e 74 uomini) presso il Laboratorio di Anatomia Patologica dell'Ospedale Santa Corona, nel periodo intercorso tra l'anno 2021 e l'anno 2022, 31 risultano essere carcinomi squamocellulari (SQ), 84 adenocarcinomi (ADC), 2 carcinomi a Grandi Cellule e 16 NSCLC-NOS (non ben definiti).

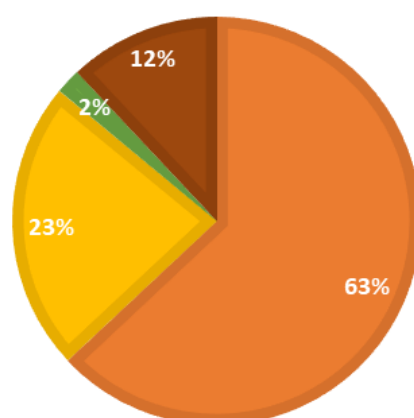
SQ	ADC	Large Cell	NSCLC-NOS
31	84	2	16

La maggior parte degli SQ è diagnosticata da biopsie bronchiali; invece, il 15% degli ADC è stato diagnosticato da metastasi (MTX), mentre il restante degli ADC deriva prevalentemente da biopsie polmonari e talora da pezzi intraoperatori polmonari.

Dallo studio emerge che le diagnosi di NSCLC ADC risulta essere uguale al 63% dei casi totali, il 23% è rappresentato da diagnosi di NSCLC SQ, il 2% da carcinoma a grandi cellule e il restante 12% da NSCLC- NOS.

CASISTICA ISTOLOGICA DELLO STUDIO

■ ADC ■ SQ ■ Large Cells ■ NSCLC NOS



I risultati ottenuti da questo studio sono in linea con la letteratura, dimostrando che più del 50% dei carcinomi polmonari è rappresentato dagli ADC, con una minoranza di SQ, Large Cell e NSCLC non ben differenziati (*Linee Guida AIOM 202*).

RISULTATI DEI MARCATORI in NSCLC non SQ: ADC, Large Cell, NSCLC-NOS

a) *EGFR*

Negli istotipi di NSCLC, ad eccezione dell'istotipo SQ, viene valutato in prima battuta il gene EGFR, recettore di membrana tirosin-chinasico, target molecolare della terapia mirata TKI.

Presso il nostro Laboratorio vengono studiate possibili mutazioni del gene EGFR con un pannello standardizzato, che prevede in contemporanea l'analisi degli esoni 18, 19, 20 e 21.



Il gene EGFR, in letteratura, ha una frequenza di mutazione che aggira tra il 15-25% di tutti i casi di NSCLC (*Linee guida AIOM 2021*).

Nei nostri casi di NSCLC, in stadio avanzato III o IV, non operabili o metastatici, la frequenza risulta essere pari al 14% (Mutazione esone 21+ Mutazione esone 19).

Dei casi in cui EGFR risulta mutato, l'esone maggiormente mutato è l'esone 19 con una frequenza dell'8%, mentre la mutazione a livello dell'esone 21 è presente nel 6% di tutti i casi EGFR mutati.

Non sono state osservate mutazioni del gene EGFR né negli esoni 18 né negli esoni 20.

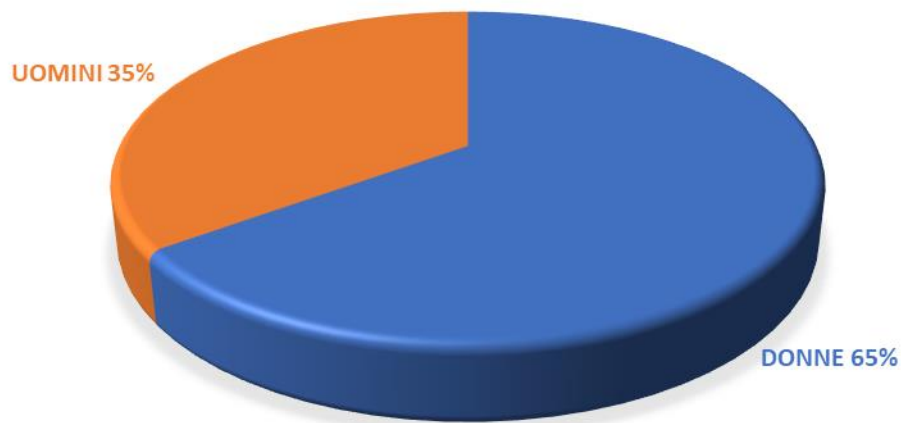


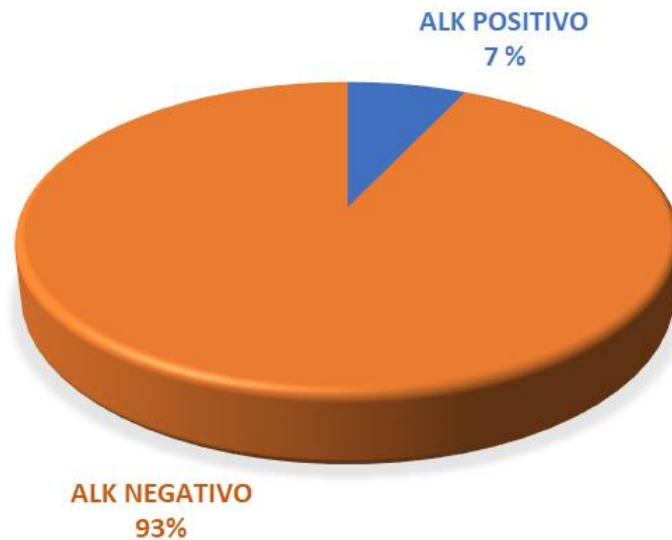
Figura 43: Frequenza della mutazione del gene EGFR esone 19 tra i due sessi.

Come da letteratura (*Linee Guida AIOM 2021*) la frequenza della mutazione del gene EGFR risulta presente, per più della metà dei soggetti affetti da ADC di origine caucasica, nei pazienti di sesso femminile (9 donne EGFR mutato e 5 uomini EGFR mutato).

Nel nostro studio la mutazione dell'esone 19 del gene EGFR si è evidenziata nel 65% nei soggetti di sesso femminile.

b) ALK

L'analisi del riarrangiamento cromosomico del gene ALK viene richiesto in prima battuta insieme alla possibile mutazione del gene EGFR.



Da letteratura il riarrangiamento cromosomico del gene ALK ha una frequenza che oscilla tra il 3-7% dei casi totali di NSCLC. Nel nostro studio sui 91 casi in cui è stato eseguito, ALK è risultato positivo per il 6,59% dei casi, confermando la frequenza attualmente nota diffusa nella popolazione in soggetti affetti da carcinoma non a piccole cellule del polmone.

c) *ROS1*

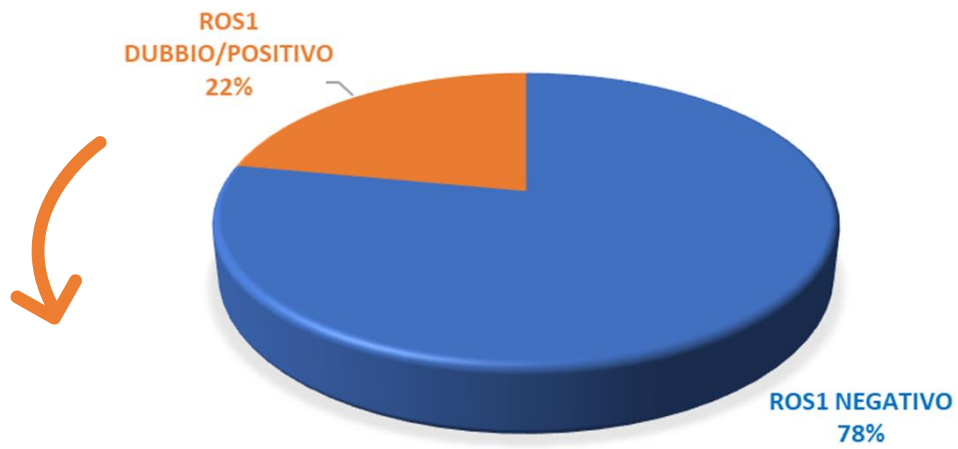


Figura 44: Valutazione del riarrangiamento ROS1 in IHC.

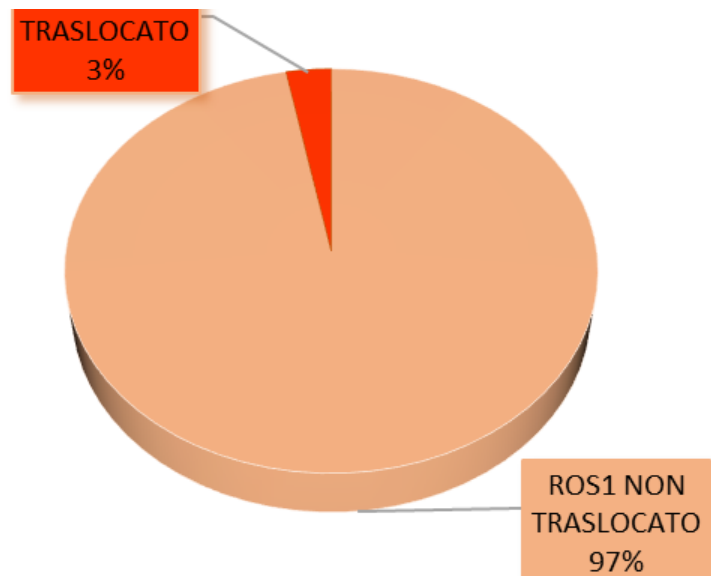


Figura 45: Valutazione del riarrangiamento ROS1 in FISH.

Per quanto riguarda la valutazione del riarrangiamento di ROS1 i risultati ottenuti in IHC hanno evidenziato un risultato dubbio/positivo nel 22% dei casi (3 positivi per ROS1 e 14 dubbi per ROS1), mentre il 78% dei casi analizzati risultava negativo.

I campioni dubbi/positivi sono stati cimentati in FISH, la quale ha confermato una reale traslocazione in 3 casi.

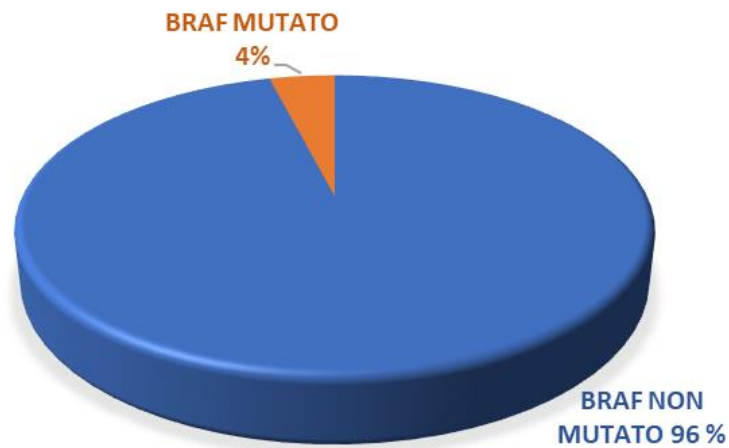
La FISH ha confermato che il 3% dei casi totali di NSCLC non SQ analizzati presenta realmente il riarrangiamento cromosomico.

La percentuale di traslocazioni di ROS1 da noi ottenuta si discosta leggermente da quelle della letteratura (1-2%). Si deve però tenere in considerazione che lo studio si è basato sui casi di NSCLC tra l'anno del 2021 e 2022.

La valutazione di ROS1 viene eseguita solo nei casi in cui il riarrangiamento di ALK risulti negativo, questo perché per entrambi i target molecolari viene applicata la stessa terapia con Crizotinib.

Spesso però nel nostro laboratorio, per una questione di tempistiche e di successiva facilitazione nella refertazione, si è seguita in contemporanea l'analisi sia di ALK sia di ROS1. Però le Linee Guida suggeriscono l'analisi sequenziale per evitare sprechi di campioni, spesso limitati per l'analisi di tutto il pannello molecolare.

d) BRAF



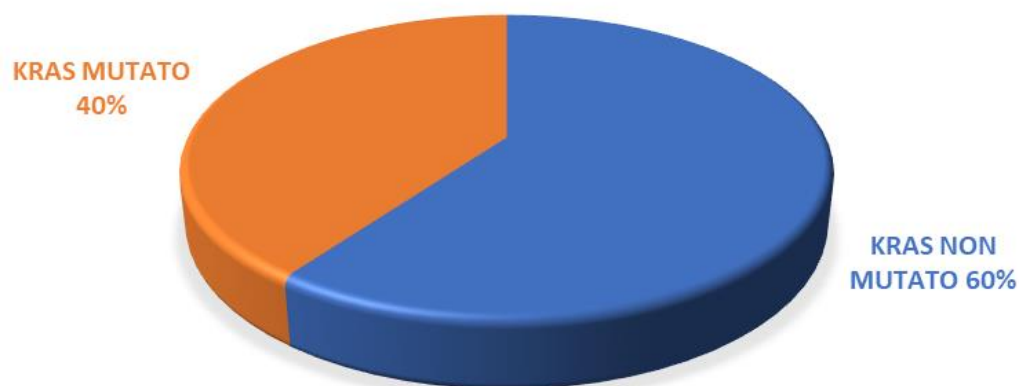
La mutazione del gene BRAF nel NSCLC, in particolar modo nei fumatori, ha nella popolazione una frequenza pari al 2-4% nella popolazione. In questo studio la frequenza della mutazione di BRAF è risultata in linea con i dati oggi disponibili, con un valore del 4% sul totale dei casi pervenuti nel nostro laboratorio.

e) KRAS

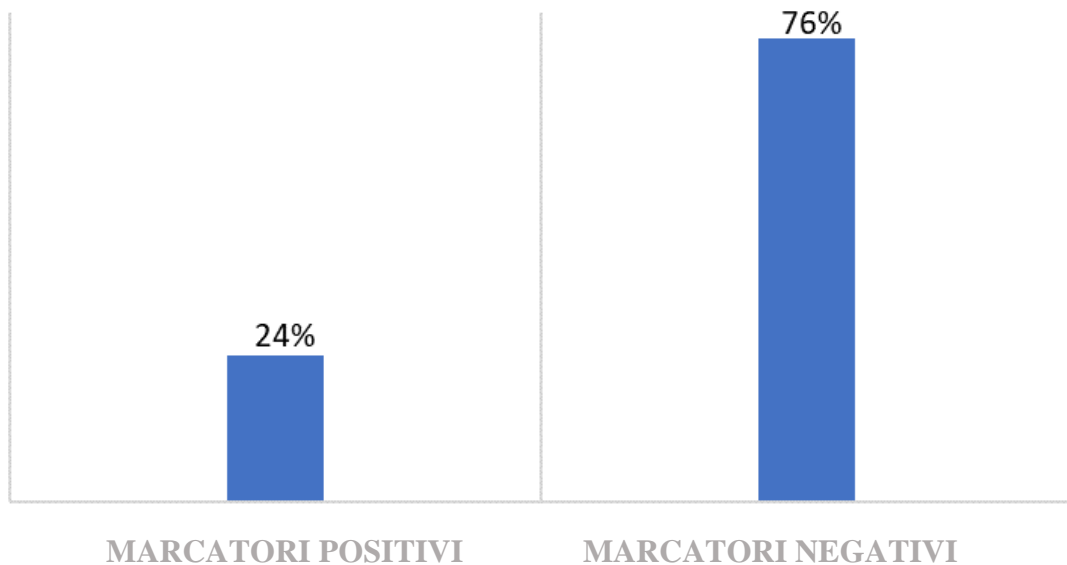
Il gene KRAS è risultato mutato nel 40% dei casi analizzati, non in linea con la letteratura, che invece indica una mutazione pari al 25%.

Il discostamento del dato ottenuto rispetto alla letteratura è dettato dal fatto che questo test è di nuova acquisizione; pertanto, fino ad oggi è stato testato solo su 10 casi, 4 dei quali positivi per la mutazione KRAS.

Il test a nostra disposizione copre 6 mutazioni: codone 12,13,59,61,117 e 146.



Dei 102 pazienti con diagnosi di NSCLC non SQ (ADC, Large Cell e NSCLC-NOS) 25 pazienti sono risultati positivi per almeno un marker molecolare, pertanto idonei ad una *terapia personalizzata*. Infatti, il 24,48% (approssimato per difetto = 24%) dei pazienti affetti da NSCLC non SQ (sul totale di 102) è candidabile alla target therapy (Vedi pag. 98). 77 pazienti (102-25=77), corrispondente al 76% dei pazienti con diagnosi di NSCLC non SQ non presenta nessun marker molecolare positivo e quindi non risultano candidabili a terapia a bersaglio molecolare.



La frequenza dello stato mutazionale di almeno un gene è del 10-20% nei soggetti caucasici con ADC, quasi in linea coi dati ottenuti da noi (24% dei 102 casi con NSCLC non squamoso), (*guida ESMO per il paziente 2019*).

f) PD-L1

Nei soggetti con NSCLC in stadio avanzato e metastatico viene considerato anche il checkpoint immunitario PD-1 e PD-L1.

L'espressione della proteina PD-L1, valutata con lo score TPS, che corrisponde alla percentuale di cellule positive su un campo di almeno 100 cellule neoplastiche, permette di selezionare i pazienti candidabili all'immunoterapia anti-PD-L1 (*Linee Guida AIOM 2021*), mostrando risultati molto efficaci in più della metà dei pazienti affetti da NSCLC non operabile.

La valutazione dell'espressione di PD-L1 segue un cut-off prestabilito dalle linee guida:

- Espressione genica < 1%: PD-L1 negativo;
- Espressione genica tra 1 e 49%: PD-L1 positivo con bassa espressione (trattamento di seconda linea)
- Espressione genica tra 50 e 100%: PD-L1 positivo con alta espressione (trattamento di prima linea)

Secondo le Linee Guida, ad oggi, i soggetti candidabili alla terapia sono quelli con l'espressione di PD-L1 maggiore all' 1%.

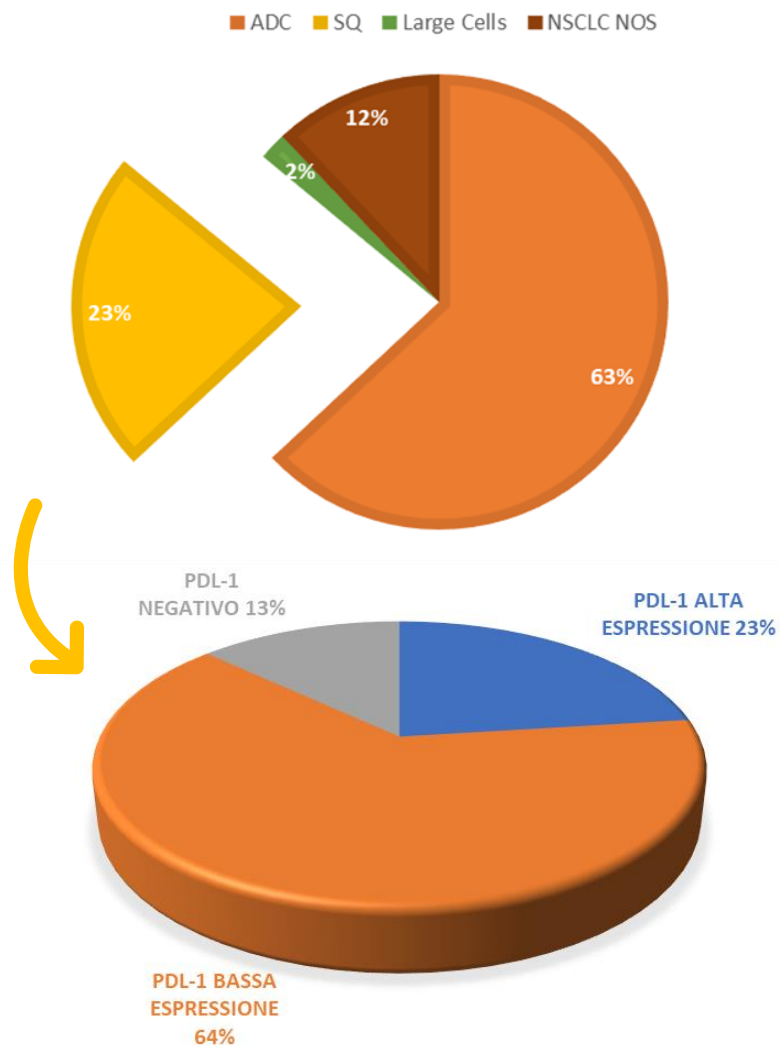


Figura 46: Espressione PD-L1 in NSCLC SQ.

Nei 31 casi confermati di SQ è stato valutato mediante tecniche di IHC l'espressione della proteina PD-L1.

Dei 31 casi, 7 pazienti (23%) presentavano alta espressione di PD-L1, 20 pazienti (64%) presentavano bassa espressione di PD-L1, mentre i restanti 4 pazienti (13%) non presentavano alcuna iper-espressione della proteina PD-L1, pertanto:

- Alta espressione di PD-L1: 23% dei pazienti è candidabile a immunoterapia di prima linea
- Bassa espressione di PD-L1: 64% dei pazienti è candidabili a immunoterapia di seconda linea

- PD-L1 negativi: 13% dei pazienti non presenta iperespressione della proteina PDL-1 e pertanto non è candidabile a nessun tipo di immunoterapia.
(Vedi Fig. 46)

In pazienti in cui è stato diagnosticato un NSCLC con istotipo squamoso non viene eseguita la ricerca di possibili mutazioni e/o traslocazioni, in quanto secondo la letteratura questa tipologia di carcinoma al polmone non presenta alcun tipo di alterazione a livello mutazionale; quindi, si parla di soggetti che non vengono trattati con terapia mirata.

Questo non esclude un possibile trattamento con immunoterapia, a cui vengono invece sottoposti quei pazienti con bassa e alta espressione della proteina PD-L1.

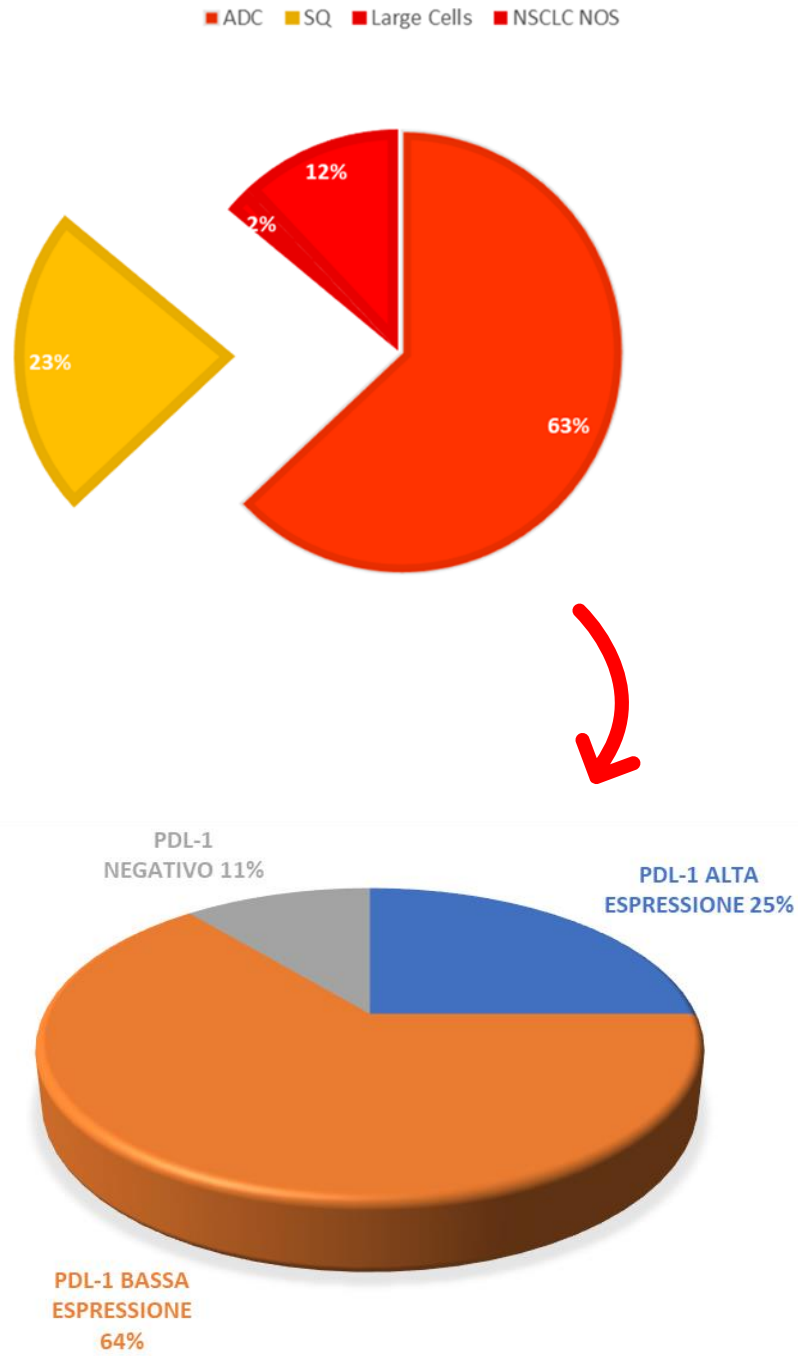


Figura 47: Espressione PD-L1 in NSCLC non SQ (ADC, Large Cell, NSCLC-NOS).

Sempre mediante tecniche di IHC è stata valutata l'espressione di PD-L1 in NSCLC non SQ, comprendente ADC, NSCLC-NOS e Large Cell.

L'espressione della proteina in questi istotipi di NSCLC risulta essere in linea con la letteratura:

- Alta espressione di PD-L1: 25%
- Bassa espressione di PD-L1: 64%
- PD-L1 negativi: 11% (*Vedi Fig. 47*)

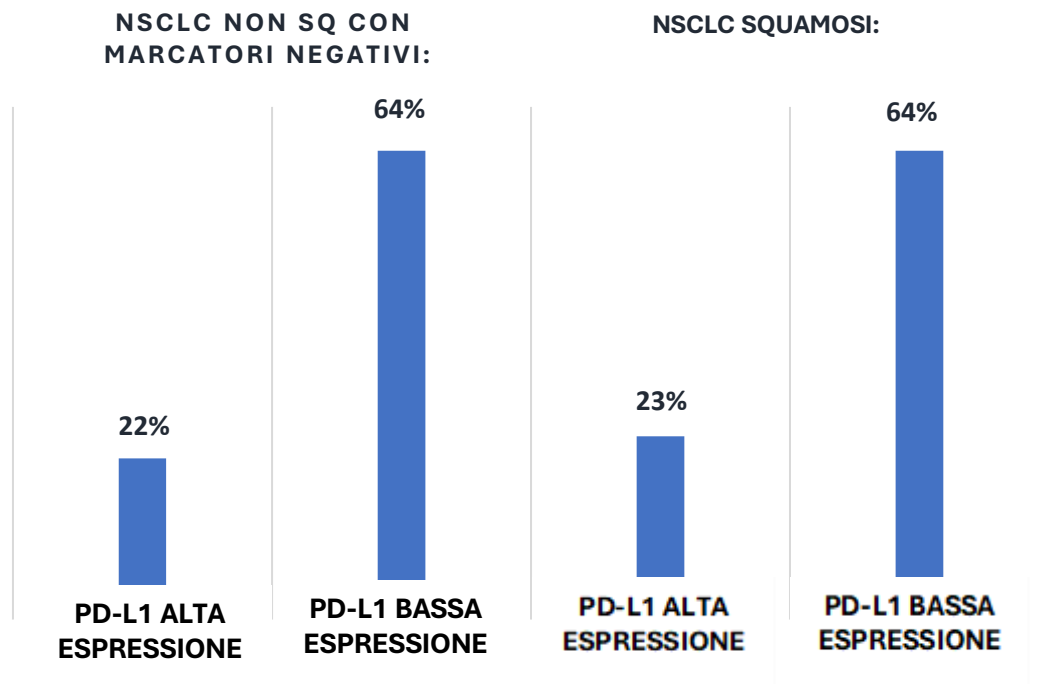


Figura 48: Rappresentazione grafica dell'espressione di PDL-1 in NSCLC non SQ (ADC, Large Cell e NSCLC-NOS) e in NSCLC SQUAMOSI.

Nel 76% di pazienti NSCLC non SQ non candidabili alla target therapy (con nessun marcatore positivo) (*Vedi pag. 89*), il 64% presenta una bassa espressione del gene PD-L1 e il 22% invece un'alta espressione di PD-L1 (49 persone affette da NSCLC non SQ con markers negativi hanno bassa espressione di PDL-1, mentre 17 persone affette da NSCLC non SQ con markers negativi hanno alta espressione di PDL-1). (*Vedi Fig.48*)

Valori simili ottenuti in pazienti con NSCLC SQ: 23% alta espressione di PD-L1 e 64% bassa espressione di PD-L1. (*Vedi Fig. 48*)

In base poi al basso o alto grado di espressione, la scelta relativa alla terapia e la conseguente valutazione dell'iter terapeutico sarà ad opera dell'oncologo.

Nei casi NSCLC non SQ che presentino almeno un marcatore positivo e alti livelli di PD-L1 è possibile trattare i pazienti con terapia combinata (a bersaglio molecolare e immunoterapia).

Nella nostra casistica abbiamo trovato 20 casi candidabili alla doppia terapia, uno solo però presenta alta espressione di PD-L1.

Il 2,94% dei 102 casi totali di NSCLC non SQ presenta due o più marcatori positivi per mutazioni e/o traslocazione in contemporanea.

I casi, da noi valutati in base alla copresenza di mutazioni, sono 3 (Tabella 8).

	CASO 1	CASO 2	CASO 3
EGFR		<i>MUTATO CODONE 19</i>	<i>MUTATO CODONE 19</i>
ROS1	<i>TRASLOCATO</i>	<i>TRASLOCATO</i>	
ALK		<i>TRASLOCATO</i>	<i>TRASLOCATO</i>
KRAS	<i>MUTATO CODONE 146</i>		

Tabella 8: Casi con presenza in simultanea di due o tre mutazioni e/o traslocazioni

Come da letteratura, la presenza di una mutazione o traslocazione non esclude la contemporanea coesistenza di due o più mutazioni/traslocazioni.

Infatti, studi recenti del 2021 hanno confutato i precedenti reports in cui si sosteneva la “*mutually exclusive*” di EGFR, ALK e ROS1.

Anche se rara, la co-mutazione di questi tre geni è possibile osservarla (vedi CASO 2) (*Yaping Z., Hui W., Xiaoyan W., Shuai L., et col -Adenocarcinoma With Coexisting EGFR, ROS1 and ALK 2021*).

12. DISCUSSIONE

In questo studio è stata presa in considerazione la ricerca dei marcatori richiesti dagli oncologi dell'ASL2 savonese nei casi con diagnosi di NSCLC in stadio III e IV pervenuti in un periodo di circa un anno tra il 2021 e il 2022.

Nella nostra casistica (133 pazienti con diagnosi di NSCLC) si è riscontrato un 63% di ADC (sulla totalità di NSCLC), 23% di SQ, 2% di Large Cell e 12% di NSCLC NOS.

Nei casi con diagnosi di NSCLC squamocellulare è stata valutata solamente l'iperespressione di PD-L1 (per la rarità del riscontro di altre alterazioni geniche in questo istotipo) (*vedi pag. 98*), mentre negli altri istotipi di NSCLC oltre a PD-L1 sono state ricercate le mutazioni di EGFR, BRAF, KRAS e i riarrangiamenti di ALK e ROS1.

I risultati di alta espressione di PD-L1 (23-25% dei casi) depongono a favore per una migliore risposta ad un trattamento immunoterapico, dato particolarmente importante nei casi di carcinomi squamosi (23% dei casi analizzati presentano alta espressione di PD-L1) e ADC che non presentano altri marcatori positivi (la quasi totalità degli ADC con alta espressione di PD-L1 non presenta altri marcatori positivi), avendo a disposizione solo questo fattore predittivo.

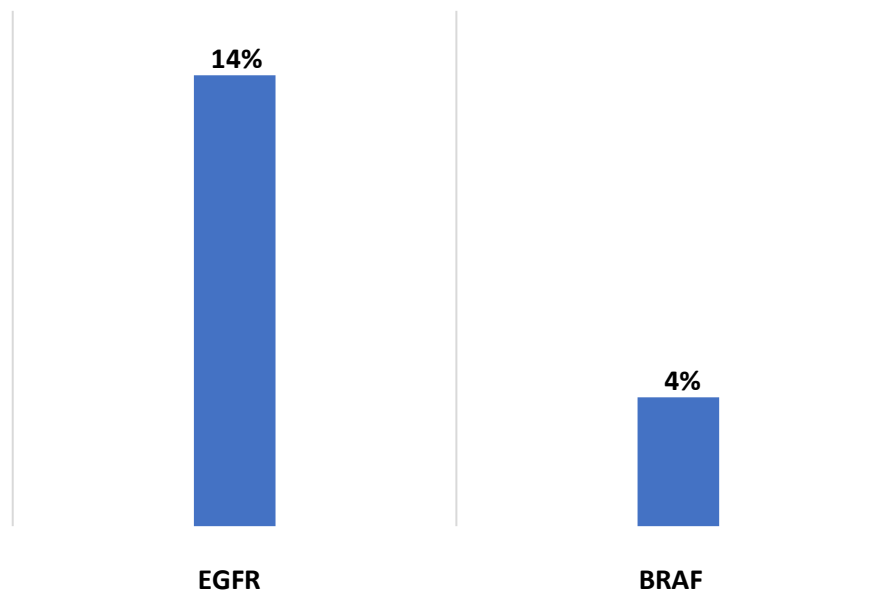
In letteratura è riportato, però, che non tutti i tumori PD-L1 positivi rispondono all'immunoterapia, mentre circa il 10% dei tumori PD-L1 negativi può rispondere al trattamento. È da considerare anche che PD-L1 è un marcatore non omogeneamente espresso nel tumore, dinamico e inducibile dal microambiente tumorale (es. infiammazione o co-espressione di altri markers). I migliori risultati di risposta si sono ottenuti con la combinazione chemioterapia-immunoterapia (*Webinar NSCLC: Tumor driver & target therapy – Università Campus Bio-Medico di Roma 2022*).

Il 14% dei casi analizzati presenta una mutazione per EGFR, prevalentemente dell'esone 19 e in donne, parzialmente in linea con i dati della letteratura, perché in generale viene riportata come più diffusa la mutazione dell'esone 21. Non abbiamo trovato mutazioni a carico dell'esone 20 (T790M), responsabile della resistenza alla terapia TKI (I e II generazione), peraltro mutazione acquisita e da

noi valutata solo all'inizio della diagnosi. Generalmente viene rivalutata la mutazione dell'esone 20 a 9-14 mesi dall'inizio della terapia con anti- TKI in seguito all'instaurarsi della resistenza acquisita al farmaco. Spesso però soggetti in stadio IV hanno una sopravvivenza inferiore all'anno (*Medicina di precisione: NSCLC, immuno-markers ed immunologica Università Campus Bio-Medico di Roma*).

Avendo il più delle volte a disposizione poco materiale neoplastico su cui eseguire i test diagnostici, perlopiù piccole biopsie, si è scelto di eseguire in contemporanea EGFR, KRAS, e BRAF su piattaforma RT-PCR, metodo consigliato da molti autori, mentre altre realtà prediligono l'analisi sequenziale di queste mutazioni coinvolte nella stessa linea di attivazione della proliferazione cellulare.

Non sono state riscontrate più mutazioni in contemporanea di questi geni, così sommando i casi positivi per EGFR e BRAF (non considerando KRAS per il numero di cimentazioni ancora esiguo) si ha il 18% dei casi di ADC che può beneficiare di una terapia mirata.



Allo stesso tempo è stato eseguito in prima battuta la ricerca per la traslocazione di ALK con la sola tecnica di IHC poiché il clone D5F3 VENTANA, su piattaforma BenchMark, è stato validato FDA-CE come corrispondente alla valutazione in FISH. Dei circa 7% dei casi trovati positivi, due casi (2%) presentano anche una mutazione per EGFR (esone 19).

In seconda battuta viene eseguito il test in IHC per ROS1, sui casi risultati ALK non traslocati, e verificata la presenza di traslocazione ROS1 in FISH nei campioni con valutazione IHC dubbia o positiva. Nel caso di ALK e ROS1 si procede sequenzialmente avendo la stessa terapia a disposizione per entrambe le traslocazioni (es. Crizotinib). È importante però eseguirle entrambe, anche se presentano una bassa percentuale di positività, per individuare tutti i pazienti candidati a questa terapia personalizzata, nella nostra casistica infatti si è passati dal 7% al 10% di neoplasie trattabili.

Abbiamo riscontrato la presenza di tre casi con più di un marcatore positivo (*Vedi Tabella 8*), in particolare due casi di traslocazione ROS1 e un caso di traslocazione ALK con mutazione anche di KRAS o EGFR, in particolare una neoplasia presentava in contemporanea traslocazione KRAS e ROS1. Questo a supporto degli ultimi lavori in letteratura che riportano casi con più alterazioni nel NSCLC, anche se a basse percentuali (*Zhenya Tang, Jianjun Zhang, Xinyan Lu et col – Coexistent genetic alterations involving ALK, RET, ROS1 or MET in 15 cases of NSCLC*), (*Yaping Zhang, Hui Wang, Xiaoyan Wang et col – Precision Treatment of Advanced Lung Adenocarcinoma with Coexisting EGFR, ALK and ROS1 mutations: a case report*).

Dei 133 casi totali di NSCLC presi in considerazione nella nostra casistica, 102 possono avere una mutazione e/o traslocazione poiché sono NSCLC non SQ (ADC, Large Cell, NSCL-NOS) e pertanto si va a valutare tutto il pannello molecolare. Dei 133 casi totali di NSCLC 31 pazienti, invece, hanno avuto diagnosi di NSCLC SQ; pertanto, si tratta di soggetti in cui si va a valutare la sola iper-espressione di PD-L1 (*vedi pag. 98*).

In definitiva: il 24% dei casi NSCLC non SQ (ADC, Large Cell, NSCLC-NOS) presenta realmente una mutazione o una traslocazione che candida i soggetti ad una terapia mirata di nuova generazione (*vedi pag. 89*), mentre dei 133 casi totali di NSCLC (NSCLC non SQ 102 + NSCLC SQ 31) il 19% presenta effettivamente una mutazione o una traslocazione, che consente l'applicazione di una terapia a bersaglio molecolare (Fig. 48).

Sull'intero campione statistico di 133 pazienti con NSCLC si è riscontrato che 25 pazienti (NSCLC non SQ) e 7 pazienti (NSCLC SQ), per un totale di 32

soggetti, presenta un'alta espressione della proteina PDL-1, pertanto il 24% dei pazienti è candidato ad immunoterapia di prima linea (Fig. 48).

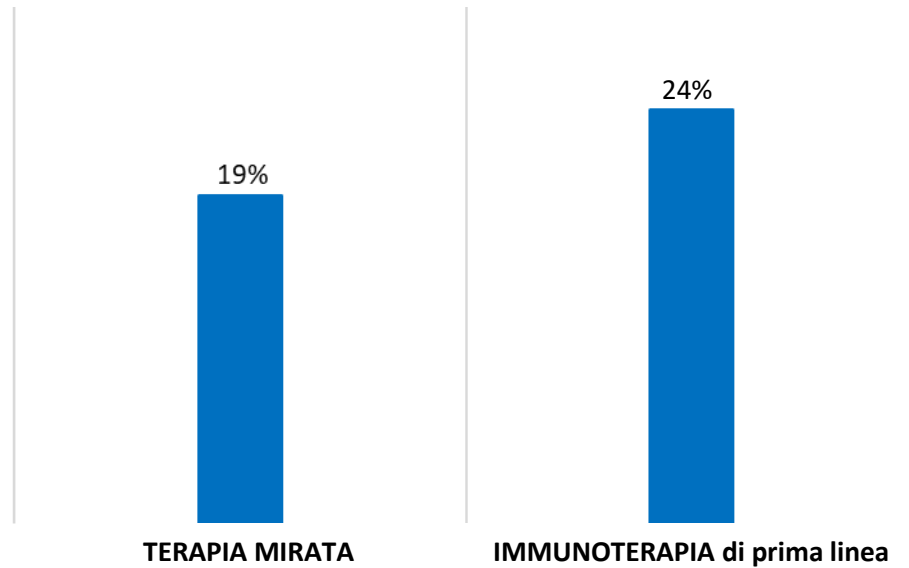


Figura 49: 19% dei 133 casi totali di NSCLC può usufruire di una terapia mirata perché presenta almeno una mutazione o una traslocazione (25 pazienti su 133 presentano almeno un marker positivo), mentre il 24% dei 133 casi totali di NSCLC può usufruire di un'immunoterapia di prima linea poiché 32 pazienti su 133 presentano un'alta espressione della proteina PDL-1.

13. CONCLUSIONI

In questo terzo millennio studi clinici, diagnostici e molecolari hanno rivoluzionato gli iter terapeutici nel campo dell'oncologia. Si è potuto constatare che non esiste “il tumore”, ma che ogni neoplasia è eterogenea nel suo istotipo e nella sua espressione molecolare.

In questo contesto, il laboratorio di Anatomia Patologica diventa di grande importanza nella diagnosi istologica e nella caratterizzazione molecolare del tumore.

Considerata l'elevata incidenza mondiale del tumore al polmone e la tardiva diagnosi, solo 2 casi su 10 vengono diagnosticati precocemente (stadio I e II), mentre i restanti in fase avanzata (stadio III e IV), situazione in cui non è più possibile applicare la resezione chirurgica a causa dell'estensione della massa tumorale o per presenza di metastasi, l'evolversi della biologia molecolare nella diagnostica oncologica ha permesso il conseguimento di nuove applicazioni in ambito terapeutico.

La tecnologia avanzata, oggi a nostra disposizione, come strumentazioni per test di Immunoistochimica, di Ibridazione Fluorescente in Situ e di Real Time-PCR, ha permesso di poter attuare nella routine quotidiana dei laboratori di Anatomia Patologica la ricerca di marcatori molecolari, ormai indispensabili per le moderne terapie personalizzate.

Nell'ultimo decennio, numerosi progressi sono stati fatti nella comprensione delle vie molecolari coinvolte nel carcinoma non a piccole cellule del polmone, in particolar modo si sono prese in considerazione quelle mutazioni, definite “driver”, che possono rappresentare il target per farmaci di nuova generazione.

L'utilizzo dei farmaci a bersaglio molecolare è associato alla presenza di mutazioni e/o traslocazioni specifiche nelle cellule tumorali, i cui prodotti sono i bersagli su cui il farmaco esercita la sua azione.

Pertanto, le nuove terapie personalizzate, agendo solo contro le cellule tumorali e limitando danni alle cellule normali, come nel caso della mutazione di EGFR, BRAF, KRAS e traslocazioni di ALK e ROS1, hanno permesso di rivoluzionare la terapia tradizionale, un tempo basata sulla sola chemioterapia e radioterapia.

Infatti, le diagnosi istologiche, sempre più precise, affiancate da indagini molecolari di ultima generazione, forniscono agli oncologi la possibilità di effettuare terapie personalizzate per i pazienti oncologici, che avranno un miglioramento in termini di sopravvivenza e qualità della vita.

La ricerca di PD-L1 come checkpoint immunitario apre, attraverso tipizzazioni immunoistochimiche, le nuove frontiere dell'immunoterapia, che utilizza farmaci capaci di potenziare il sistema immunitario rendendolo in grado di riconoscere e distruggere le cellule tumorali. Queste terapie costituiscono un'innovazione e possono coadiuvare il trattamento di innumerevoli tipi di tumori.

In un prossimo futuro, oltre alle tecniche diagnostiche molecolari già in un uso, si assisterà all'inserimento nella routine di ulteriori piattaforme, quali l'NGS, sequenziamento del DNA di nuova generazione che, grazie alla sua velocità, sensibilità e specificità, rappresenterà una rivoluzione nella ricerca biologica e medica. Attualmente, nel nostro Laboratorio si sta allestendo la tecnica NGS per la valutazione mirata di NTRK, MET, RET ed HER2. Queste alterazioni, seppur rare, sono diventate bersaglio di trattamenti specifici; infatti, risultati ottenuti da studi di fase 1 e 2 sono incoraggianti, sebbene tali terapie non siano ancora rimborsate dal SSN, si pensa che a breve possano essere introdotte nei piani terapeutici di pazienti con NSCLC in stadio III e IV.

Nonostante i grandi passi in avanti fatti nel campo della diagnostica molecolare, molti ancora sono i limiti, quali ad esempio la resistenza ai farmaci, che in alcuni pazienti può determinare quello che viene considerato il fallimento terapeutico, sviluppatasi in seguito all'acquisizione di mutazioni secondarie o per la sopravvivenza di un clone resistente nel corso della terapia di prima linea.

Proprio per questo nei laboratori, ove disponibile, per il NSLC viene eseguita la ricerca di mutazioni secondarie, come ad esempio T790M per l'inserzione dell'esone 20 di EGFR, per la quale ad oggi esiste un farmaco alternativo (inibitore TKI di III generazione) convenzionato dal Sistema Sanitario Nazionale.

Questo è reso possibile grazie all'applicazione della biopsia liquida, tecnica non invasiva, che utilizza come matrice di partenza il sangue periferico, permettendo,

così, di indirizzare quella categoria di pazienti con presenza di mutazione secondaria acquisita ad una terapia di seconda linea.

Alla luce di quanto detto, i laboratori di Biologia Molecolare assumono un ruolo di estrema centralità in tutto il percorso diagnostico e, col passare degli anni, andranno incontro ad inevitabili innovazioni, che permetteranno l'ampliamento delle conoscenze e delle pratiche terapeutiche.

Ad oggi, la speranza ricade nella ricerca di nuove mutazioni “driver”, attualmente allo studio, e nella scoperta e validazione di nuove terapie mirate, approvate e rimborsate dal Sistema Sanitario Nazionale come trattamenti sia di prima sia di seconda linea.

Tutto questo però non significa debellare il tumore al polmone nei pazienti con NSCLC al III o IV stadio, ma allungare i tempi liberi da malattia con una buona qualità di vita in quei pazienti che fino a poco tempo fa venivano trattati con la sola chemioterapia ed avevano un'aspettativa di vita molto breve.

14. BIBLIOGRAFIA

- *Lung cancer in never smokers; Sophie Sun, Jhoan H. Schiller, Adi F. Gazdar, 7(10),778-790,2007;*
- *Linee Guida AIOM 2021;*
- *Ernai V., Ganti AK. Immunotherapy in treatment advanced NSCLC. J Thorac Dis. 2018 Feb;*
- *Webinar” Il profilo mutazionale del carcinoma polmonare” – Università Campus Bio-Medico di Roma (<https://ecm.unicampus.it/>);*
- *D.S. Salomon et Coll.- Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies, - Critical reviews in Oncology/hematology 19(3) - (1995) 183-232.*
- *X. Zhang, et coll. - An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor - Cell 125(6) (2006) 1137-49.*
- *Sharma Sreenath V., et al. Epidermal growth factor receptor mutations in NSCLC. Nature Reviews Cancer 2007, 3.169;*
- *S.S. Ramalingam et al. - Phase I/II study of mobocertinib in EGFR exon 20 insertion (ex20ins) + metastatic mNSCLC): Updated results from platinum-pretreated patients (PPP) – OncologyPRO-ESMO Congress- 10-09-2022;*
- *D Ross Camidge et al. - Brigatinib Versus Crizotinib in ALK Inhibitor-Naive Advanced ALK-Positive NSCLC: Final Results of Phase 3 ALTA-1L Trial - J Thorac Oncol. 2021 Dec;16(12):2091-2108;*
- *Sabari JK, et al. Amivantamab in post-platinum EGFR Exon 20 insertion mutant non-small cell lung cancer. IASLC 2020 World Conference on Lung Cancer Singapore; abstract OA04.04, -d07add97c31, Meeting Cochair Honors Immunotherapy Era in Lung Cancer December 19, 2021 Lisa Astor, Targeted Therapies in Oncology, December 1, 2021, Volume 10, Issue ;*
- *Mok TS, et al., Improvement in overall survival in randomized mutations. J Clin Oncol. 2018;36(22):2244-50;*

- WU., Ya-lan, et al. *Conventional real-time PCR-based detection of T790M using tumor tissue or blood in patients with EGFR TKI-resistant NSCLC*. 2017, 10.3307;
- L.V. Sequist, et Al. - *Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors*, *Science translational medicine* 3(75) (2011);
- Morgillo F. et al. *Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: lung cancer*. *ESMO Open*. 2016; 11; e000060.eCollection 2016;
- Gruber K, Horn H, Kalla J, Fritz P, Rosenwald A, Kohlhäufel M, Friedel G, Schwab M, Ott G, Kalla C. *Detection of rearrangements and transcriptional up-regulation of ALK in FFPE lung cancer specimens using a novel, sensitive, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay*. *J Thorac Oncol*. 2014 Mar;9(3):307-15. doi: 10.1097/JTO.000000000000068. PMID: 24495999.
- Zhu QG, Zhang SM, Ding XX, He B, Zhang HQ. *Driver genes in non-small cell lung cancer: Characteristics, detection methods, and targeted therapies*. *Oncotarget*. 2017 Apr 10;8(34):57680-57692. doi: 10.18632/oncotarget.17016. PMID: 28915704; PMCID: PMC5593676.
- *Quotidianosanita.it - 14 settembre 2021*;
- Gregory J. Riely, Jenifer Marks, and William Pao, 2008 *Clin Cancer Res* (2008) 14 (22): 7519–7525.
- A.I. Spira, et al. *KRYSTAL-1: activity and safety of adagrasib (MRTX849) in patients with advanced/metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring a KRAS G12C mutation*. *J Clin Oncol* 2022;40(suppl 16):9002;
- Sithanandam G, et al. "Complete coding sequence of a human Braf cDNA and detection of Braf protein kinase with isozyme specific antibodies" *Oncogene*, vol. 5, n° 12, dicembre 1990, p. 1775–80;
- Planchard D, Johnson BE - *BRAF Adds an Additional Piece of the Puzzle to Precision Oncology-Based Treatment Strategies in Lung Cancer*. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(7):796–797;

- Lantuejoul S, et al. Programmed death ligand 1 immunohistochemistry in non-small cell lung carcinoma. *J Thorac Dis.* 2019;11(Suppl 1): S89-S101;
- Cortellini A., Gambale E., Cannita K., Barocco D., Parisi A., Napoleoni, Masedu F. *Thoracic Cancer* 9(2), 241-252,2018;
- WU, Ya-lan, et al. Conventional real-time PCR-based detection of T790M using tumor tissue or blood in patients with EGFR TKI-resistant NSCLC. 2017, 10.3307;
- WU, Zhen, et al. Update on liquid biopsy in clinical management of NSCLC. *Oncotargets and therapy* 2019, 12.5097;
- Conde Esterh et al., *Journal of Thoracic Oncology*, Vol.14, No. 12:2120-2132 2019;
- Yoshida A., Kohno T., Tsuta K., et al. ROS1-rearranged lung cancer: a clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(4):554-562;
- (Ao, Ming-Hui, et al. "The utility of a novel triple marker (combination of TTF1, napsin A, and p40) in the subclassification of non-small cell lung cancer." *Human pathology* 45.5 (2014): 926-934;
- *Diagnosi of NSCLC in small biopsies and cytology: implication of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer*,137 (5), 668,-684, Travis W.D e coll., 2011;
- *IASLC Atals of ALK and ROS1 testing in Lung Cancer*, Ming Sound Tsao et al. 2018;
- Shaw AT et al. Crizotinib in ROS1 – rearranged non small-cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Arch* (2016) 469:489-503;
- Lindeman NI, et al. Uptadted Molecoular Testing GuidLine fot the Selection of NSCLC Patients for treatment with targetef tyrosine kinase inhibitors: guideline from the Collage of American Pathologist, the international association for the study of Lung Cancer, and the association for Molecular Pathology *Arch Pathol Lab Med.* 2018 Mar,142(3):321-346;

- *McLeer-Florin A., Moro-Sibilot D., Melis A., et al: Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in NSCLC in a routine practice: a French study. J Thorac Oncol. 2012;7(2):348-354;*
- *Cutz JC, Craddock KJ, Torlakovic E., et al., Canadian anaplastic lymphoma kinase study: a model for multicenter standardization and optimization of ALK testing in lung cancer. J Thorac Oncol. 2014; 9:1255-1263;*
- *Yatabe Y., ALK FISH and IHC: you cannot have one with-out the other. J Thorac Oncol.2015;10:548-550;*
- *Medicina di precisione: polmone avanzato metastatico – Università Campus Bio-Medico di Roma 2022(<https://ecm.unicampus.it/>);*
- *Fattori prognostici preoperatori: pro e contro della biopsia diagnostica ed esame istologico definitivo– Università Campus Bio-Medico di Roma 2022(<https://ecm.unicampus.it/>);*
- *NSCLC: Tumor driver & target therapy– Università Campus Bio-Medico di Roma 2022(<https://ecm.unicampus.it/>);*
- *Il profilo mutazionale del carcinoma polmonare – Università Campus Bio-Medico di Roma 2022 (<https://ecm.unicampus.it/>);*
- *Zhenya Tang, Jianjun Zhang, Xinyan Lu et col – Coexistent genetic alterations involving ALK, RET, ROS1 or MET in 15 Cases of NSCLC, Modern Pathology (2018) 31, 307–312; doi:10.1038/modpathol.2017.109; published online 15 September 2017.*
- *Yaping Zhang, Hui Wang, XIAoyan Wang et col – Precision Treatment of Advanced Lung Adenocarcinoma with Coexisting EGFR, ALK and ROS1 mutations: a case report, Vol. 22, No. 5, e699–e702.*

15. RINGRAZIAMENTI

Chiudo gli occhi e ritorno a quel 16 giugno 2022, ancora è nitido il ricordo: mio padre a terra senza coscienza, io che mi aggrappo alla vita alle prese col massaggio cardiaco.

Riapro gli occhi, è il 16 dicembre 2022, l'agitazione è alle stelle, ma l'unica cosa che conta è lo sguardo di mio padre che incrocia il mio.

Da quella caduta ne sono cambiate di cose, eppure non mi sono mai sentita fortunata come ad oggi.

A metà del mio tirocinio presso il Laboratorio di Anatomia Patologica e già depositato il titolo della mia tesi “Nuovi Fattori Prognostici e Predittivi del Carcinoma non a piccole cellule del Polmone”, si sono verificati un concatenarsi di eventi, che a me piace definire fortuiti, che senz'ombra di dubbio hanno cambiato il mio modo di vedere la vita.

Una diagnosi improvvisa: Adenocarcinoma polmonare allo stadio I.

Inutile dire che, da quel giorno, la stesura di questa tesi è stata per me una grande salita, ripida, tortuosa e ricca di imprevisti dolorosi, che però ho affrontato, non solo con l'aiuto dei miei genitori e di mio fratello, ma anche con la mia seconda famiglia: il personale del Laboratorio di Anatomia Patologica dell'Ospedale Santa Corona di Pietra Ligure.

Mi sento in dovere con tutti loro, professionisti e persone fantastiche, che, in silenzio dietro ad un grande sipario, dirigono, facendo battere all'unisono, il vero cuore dell'Ospedale.

Grazie ai segretari, ai tecnici di laboratorio: Carla, Elisa, Eleonora, Simona, Gabriele e Alessia A., quest'ultima, oramai anche grande amica.

Le Dottoresse Anna Dellachá, Sara Bruno ed Elena Pacella, professioniste, donne e soprattutto mamme.

Un grazie speciale alla mia relatrice, la Prof.ssa Furfaro, che, a conoscenza della mia situazione, è riuscita sempre con estrema delicatezza ad indirizzarmi sulla giusta strada.

Il mio grazie più sentito va alla Dott.ssa Maria Angela Ferro, professionista dalle infinite conoscenze e donna dal cuore buono.

Non nego, che più volte, nel corso di questi duri mesi, mi sono ritrovata cosparsa da un velo di pessimismo, che mi ha portato a non capire appieno il verso senso di questo lavoro. Ma la positività e la grinta della Dott.ssa Ferro mi hanno permesso di tirare fuori la parte più nascosta di me: il coraggio.

Ricordo quei giorni in cui mi recavo all'Ospedale con quel grosso nodo alla gola, tutte le paure date dalle mie nuove conoscenze non mi permettevano né di accostare la mente verso altri pensieri e né di comprendere il lato positivo di ciò che stava accadendo.

Nonostante questo, la Dott.ssa Ferro non ha mai permesso che io potessi abbandonarmi a pensieri negativi, ma anzi, ha fatto leva su tutte le mie conoscenze, apprese da lei nei mesi precedenti, per poter ragionare a mente lucida sul caso di mio padre.

La sua esperienza sul campo, la sua saggezza e calma mi hanno letteralmente salvata e di tutto questo gliene sarò grata a vita.

Grazie alle mie amiche: Beatrice, Diana, Erika, Glenda e Alessia D., che con discrezione hanno conservato scrupolosamente nel loro cuore le mie paure e il mio dolore.

Grazie a mio zio Roberto, grazie per tutti quei caffè presi prima di ogni esame... per una manciata di giorni non siamo riusciti a sorseggiarci l'ultimo conclusivo della mia carriera universitaria, ma nel mio cuore rimarrà per sempre nitido questo nostro dolce rituale.

Ed infine, ringrazio mia madre, a cui non ho mai visto versare una lacrima, minuta e indifesa, ma con una forza disumana,

ringrazio poi mio fratello Vittorio, ormai uomo forte sicuro di sé,

Achille, mia fedele spalla, sempre pronto a strapparmi un sorriso

e mio Padre, che non ha mai avuto paura.

Grazie alla mia Famiglia, di sangue e acquisita, vera forza motrice della mia nuova vita.

Mi sono immersa nel profondo più nascosto di questo lavoro, ho vissuto tutto questo sia dal punto di vista professionale che da quello personale.

Ho toccato con mano il vero dolore, ma è proprio questo che mi ha permesso di riemergere e di capire con certezza ciò che voglio essere un domani.

Grazie!