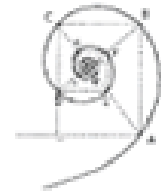




Università degli Studi di Milano
Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare



Curriculum di Oncologia Molecolare

Ciclo XXVI

Anno Accademico 2012-2013

Dottorando: Chiara LO RUSSO

**Analisi comparativa di metodiche molecolari
per la determinazione dello stato mutazionale
di EGFR in pazienti con carcinoma del polmone
non a piccole cellule**

Tutore: Prof. Massimo RONCALLI
Co-tutore: Dott.ssa Annarita DESTRO

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Mario Clerici

RIASSUNTO

Il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) è un recettore transmembrana ad attività tirosin-chinasica attivabile da diversi ligandi. Questo evento innesca una cascata di segnali a valle con effetti sulla sopravvivenza e la proliferazione cellulare. L'evento mutazionale di EGFR è in grado di indurre l'attivazione costituzionale che può essere efficacemente bloccata dalla somministrazione di farmaci ad azione anti-recettoriale. La valutazione del profilo mutazionale di EGFR costituisce un'indagine fondamentale per selezionare pazienti portatori di carcinoma polmonare non a piccole cellule avanzato (NSCLC) candidabili a terapia con farmaci specifici. Infatti le mutazioni di EGFR sono riportate in una sottopopolazione di pazienti (8-20%) con NSCLC, che cresce in soggetti non fumatori, di sesso femminile e di razza asiatica. Le mutazioni più frequenti (90% dei campioni mutati) sono localizzate nell'esone 19 (delezioni in frame: E746-A750) e nell'esone 21 di EGFR (sostituzioni puntiformi: L858R). Diverse tecnologie sono utilizzate per valutare l'assetto mutazionale di EGFR tra cui il sequenziamento di Sanger, il pirosequenziamento e la Real Time PCR. Anche l'immunoistochimica è stata proposta, ancorchè non validata, come possibile indagine complementare a quelle di tipo molecolare.

Lo scopo del presente lavoro è di condurre una analisi comparativa di queste tecnologie (sequenziamento di Sanger, pirosequenziamento ed immunoistochimica) in una serie di pazienti con carcinoma polmonare primitivo non a piccole cellule. La valutazione dei risultati ha tenuto conto sia dell'accuratezza delle metodologie che di altri fattori quali tempo di esecuzione, complessità della procedura e rapporto costi/benefici.

Utilizzando linee cellulari tumorali contenenti diluizioni scalari di alleli mutati di EGFR (1, 10, 20, 50%) abbiamo preliminarmente stabilito che il pirosequenziamento nelle nostre mani è in grado di rilevare in una popolazione tumorale il 10% di alleli mutati a fronte del 20% di alleli mutati rilevati dal sequenziamento di Sanger. Abbiamo successivamente validato l'accuratezza diagnostica di queste metodologie nel nostro laboratorio nell'ambito di due programmi di controlli di qualità sviluppati a livello nazionale su casistiche esterne.

Lo studio comparativo tra sequenziamento di Sanger e pirosequenziamento è stato condotto su 258 carcinomi polmonari primitivi, di cui 229 adenocarcinomi, utilizzando materiale istologico d'archivio fissato in formalina ed incluso in paraffina che comprendeva sia materiale di origine chirurgica da procedure terapeutiche (resezioni polmonari) che da procedure diagnostiche (biopsie).

La frequenza mutazionale rilevata dal pirosequenziamento è stata pari al 13,1% , superiore a quella rilevata utilizzando il sequenziamento di Sanger 11,4%. Sull'intera popolazione di carcinomi polmonari primitivi con mutazione di EGFR (n=26) il guadagno in termini di sensibilità del pirosequenziamento rispetto al sequenziamento di Sanger è stato pari al 15,4% (4/26 casi). È interessante sottolineare come i casi identificati come mutati dal Pirosequenziamento e non dal sequenziamento di Sanger provenissero da

campioni a ridotta cellularità tumorale (2 biopsie e 2 microdissezioni chirurgiche). Questo dato risulta particolarmente significativo in considerazione del fatto che lo studio mutazionale di EGFR è oggi condotto quasi esclusivamente su materiale biotico prelevato da pazienti con carcinoma polmonare in fase avanzata e dunque non operabile.

Abbiamo successivamente valutato l'accuratezza diagnostica dell'immunoistochimica nell'identificazione di specifiche mutazioni di EGFR. A questo scopo sono stati immunocolorati 73 adenocarcinomi a profilo mutazionale noto al pirosequenziamento [41 casi mutati per l'esone 19 di EGFR (E746-A750del) e 31 mutati per l'esone 21 (L858R)] utilizzando anticorpi anti-E746-A750del per l'esone 19 e anti-L858R per l'esone 21. L'accuratezza diagnostica dell'immunoistochimica è risultata essere compresa tra l'80,3% (anticorpo anti-E746-A750del) e 90,7% (anticorpo anti-L858R) con specificità assoluta e sensibilità variabile dal 67,7% al 69,0%. Complessivamente la tecnica immunoistochimica, seppur limitata all'identificazione dei due eventi mutazionali più frequenti, è risultata sufficientemente accurata e con costi decisamente più contenuti e tempi di esecuzione più veloci rispetto alle indagini molecolari.

In conclusione, il nostro studio documenta sia l'idoneità che la superiorità del pirosequenziamento rispetto al sequenziamento di Sanger per quanto attiene la capacità di rilevare la presenza di mutazioni di EGFR in una casistica consecutiva di carcinomi polmonari primitivi non a piccole cellule. L'immunoistochimica è risultata invece tecnica meno sensibile nel determinare l'assetto mutazionale degli stessi casi. Trattandosi tuttavia di tecnica egualmente specifica ancorchè meno costosa e più rapida rispetto alle prime due, ne è ipotizzabile l'utilizzo in diagnostica clinica quale indagine preliminare di screening dei più frequenti eventi mutazionali.

ABSTRACT

The epidermal growth factor receptor (EGFR) is a transmembrane receptor with tyrosine-kinase activity that can be activated by different ligands. This event triggers a cascade of signals downstream with effects on cell survival and proliferation. The mutational event of EGFR is able to induce the constitutional activation that can be effectively blocked by the administration of drugs with anti-receptor activity. The evaluation of EGFR mutational profile is a fundamental survey to select patients affected by advanced non-small cell lung cancer (NSCLC), which can undergo treatment with specific drugs. In fact, EGFR mutations are reported in a subpopulation of patients (8-20 %) with NSCLC, which grows in non-smokers, being female and belonging to Asian race. The most frequent mutations (90 % of the mutated samples) are located in Exon 19 (in-frame deletions: E746 - A750) and Exon 21 of the EGFR (point substitutions: L858R). Different technologies are used to evaluate the EGFR mutational status, including Sanger Sequencing, Pyrosequencing and Real Time PCR. Immunohistochemistry has also been proposed, even if not validated as a possible investigation complementary to those of molecular type.

The purpose of the present work is to carry out a comparative analysis of these technologies (Sanger Sequencing, Pyrosequencing and Immunohistochemistry) in a series of patients with primary non-small cell lung cancer. The evaluation of the results took into account both the accuracy of the methods and other factors such as execution time, complexity of the procedure and cost/benefit ratio.

Using tumor cell lines containing scalar dilutions of EGFR mutated alleles (1, 10, 20, 50%) we preliminarily stated that the Pyrosequencing in our hands, within a tumor population, is able to detect 10% of mutated alleles compared to 20% of mutated alleles detected by Sanger Sequencing.

Then, we validated the diagnostic accuracy of these methods in our laboratory as part of two programs of quality controls developed at the national level on external occurrences.

The comparative research between Sanger Sequencing and Pyrosequencing was carried out on 258 primary lung carcinomas, including 229 adenocarcinomas, using archival histological material formalin-fixed and paraffine-included which comprised materials of surgical origin both from therapeutic procedures (lung resections) and from diagnostic procedures (biopsies).

The frequency of mutation detected by Pyrosequencing was 13,1% , higher than the one observed using Sanger Sequencing of 11,4%. Over the entire population of primary lung cancer with EGFR mutation (n=26), the gain in sensitivity of Pyrosequencing compared to Sanger Sequencing was 15,4% (4/26 cases). It is interesting to note that the cases identified as mutated by Pyrosequencing (not by Sanger Sequencing) came from samples characterized by reduced tumor cells (2 biopsies and 2 surgical microdissections). This finding is particularly significant taking into account the fact that EGFR mutation study is at present almost exclusively carried out on biptic material taken from patients with lung cancer in advanced phase and thus inoperable.

We then evaluated the diagnostic accuracy of immunohistochemistry in identifying typical mutations of EGFR. For this purpose, 73 adenocarcinomas with mutational profile related to Pyrosequencing [41 cases mutated for Exon 19 of EGFR (E746–A750del) and 31 mutated for Exon 21 (L858R)] were immunocolored using antibodies anti-E746-A750del for Exon 19 and anti-L858R for Exon 21.

The diagnostic accuracy of immunohistochemistry was found to be between 80,3% (antibody anti-E746-A750del) and 90,7% (antibody anti-L858R) with absolute specificity and sensitivity ranging from 67,7% to 69,0%. Overall, the immunohistochemical technique, even if limited to the identification of the two most frequent mutational events, turned out to be accurate enough and with much lower costs and execution times faster than molecular investigations.

To sum up, our research proves both the suitability and the superiority of Pyrosequencing compared to Sanger Sequencing as for the ability to detect the presence of EGFR mutations in a consecutive series of primary non-small cell lung carcinomas. On the contrary, immunohistochemistry turned out to be a technique less sensitive in determining mutational arrangements of the same cases. Since this technique proved to get the same specificity and to be less expensive and faster than the first two, it is possible to use it in clinical diagnostics as preliminary screening investigation of the most frequent mutational events.

SOMMARIO

RIASSUNTO.....	2
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUZIONE	8
1.1. EPIDEMIOLOGIA E FATTORI EZIOLOGICI DEL CARCINOMA POLMONARE.....	8
1.2. ISTOLOGIA.....	9
1.2.1. ADENOCARCINOMA.....	9
1.2.2. CARCINOMA A CELLULE SQUAMOSE.....	11
1.2.3. CARCINOMA A GRANDI CELLULE.....	12
1.2.4. MICROCITOMA (CARCINOMA POLMONARE A PICCOLE CELLULE).....	13
1.3. STADIAZIONE E PROGNOSI	14
1.4. STRATEGIA DIAGNOSTICA.....	16
1.5. TERAPIA.....	17
1.5.1. CHIRURGIA.....	17
1.5.2. CHEMIOTERAPIA.....	18
1.5.3. CHEMIOTERAPIA ADIUVANTE.....	18
1.5.4. RADIOTERAPIA.....	19
1.5.5. TERAPIE BIOLOGICHE E TARGET THERAPY.....	19
1.6. EGFR: MARCATORE MOLECOLARE PREDITTIVO DI SENSIBILITA' AL TRATTAMENTO CON INIBITORI DEI RECETTORI TIROSIN-CHINASICI.....	22
1.7. METODICHE DI VALUTAZIONE DELLE MUTAZIONI DI EGFR.....	29
1.8. CONTROLLI DI QUALITÀ DI EGFR.....	31
1.8.1. CONTROLLO DI QUALITÀ ESTERNO.....	31
1.8.2. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO.....	32
2. SCOPO DELLA RICERCA.....	34
3. MATERIALI E METODI.....	35
3.1. CASISTICA.....	35
3.2. ESTRAZIONE DI DNA DA TESSUTO FISSATO IN FORMALINA ED INCLUSO IN PARAFFINA.....	35
3.3. AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR.....	35
3.4. SEQUENZIAMENTO DI SANGER.....	35
3.5. PIROSEQUENZIAMENTO.....	36

3.6. ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA	36
4. RISULTATI	37
4.1. SAGGIO DI SENSIBILITA' DEL TEST MOLECOLARE MEDIANTE SEQUENZIAMENTO DI SANGER E PIROSEQUENZIAMENTO.....	37
4.2. TEST DI DETERMINAZIONE DELL'ASSETTO MUTAZIONALE DI EGFR: ACCURATEZZA DIAGNOSTICA.....	40
4.3. SEQUENZIAMENTO DI SANGER.....	41
4.4. PIROSEQUENZIAMENTO	43
4.5. CONFRONTO TRA SEQUENZIAMENTO DI SANGER E PIROSEQUENZIAMENTO	44
4.6. IMMUNOISTOCHEMICA	46
5. DISCUSSIONE.....	48
6. APPENDICI	53
6.1. CASISTICA	53
6.2. ESTRAZIONE DI DNA DA TESSUTO FISSATO IN FORMALINA ED INCLUSO IN PARAFFINA.	54
6.3. QUANTIFICAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI DNA MEDIANTE SPETTROFOTOMETRO	55
6.4. AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR	57
6.5. ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO.....	58
6.6. SEQUENZIAMENTO DI SANGER.....	59
6.7. PIROSEQUENZIAMENTO	63
6.8. ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA	74
7. BIBLIOGRAFIA.....	76

1. INTRODUZIONE

1.1. EPIDEMIOLOGIA E FATTORI EZIOLOGICI DEL CARCINOMA POLMONARE

La principale causa di morte e di invalidità per patologia neoplastica a livello globale, indipendentemente dal genere, è rappresentata dai carcinomi polmonari. Più di un milioni di morti/anno sono il tangibile segno di questo primato. L'incidenza e la prevalenza, stabili fino al XX secolo, sono incrementate esponenzialmente a partire dagli anni '50, sino a raggiungere oggi un tasso d'incidenza mondiale di 1.350.000 nuovi casi/anno (12-15% fra tutte le neoplasie diagnosticate annualmente nei paesi sviluppati)¹. I dati epidemiologici evidenziano differenze di genere, con un aumento maggiore dell'incidenza nelle donne (negli ultimi 20 anni il rapporto uomini/donne è passato da 5:1 a 2:1). La sopravvivenza dei pazienti con carcinoma polmonare rimane bassa: 15% a 5 anni in Europa, senza differenze tra i sessi². La sopravvivenza dipende fortemente dall'età alla diagnosi, essendo maggiore nei pazienti giovani rispetto ai pazienti anziani. Nei pazienti di giovane età (15-44 anni) la sopravvivenza relativa a cinque anni è del 18% rispetto al solo 6% nei pazienti con età superiore ai 75 anni. La considerevole variazione di sopravvivenza, suggerisce l'importanza di una prevenzione precoce^{3 4}. I pazienti con uno stadio tumorale avanzato, raramente sopravvivono cinque o più anni (1-2%), mentre quelli con uno stadio localizzato hanno una sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi di circa il 30%^{5 6 7}.

A differenza di quanto accade in altri organi, i carcinomi polmonari sono maligni nella stragrande maggioranza dei casi, cioè capaci di dare recidive locali dopo resezione chirurgica o metastasi a distanza e sono generalmente scoperti in fase avanzata quando le possibilità di cura sono drammaticamente ridotte. Infatti, meno di un quinto dei carcinomi del polmone sono diagnosticati in fase iniziale, quando il tumore è ancora confinato al polmone e senza metastasi ai linfonodi regionali. Tuttavia, anche questi casi con aspettativa di vita potenzialmente migliore, manifestano un tasso di sopravvivenza a 5 anni inaspettatamente basso⁸. L'evenienza di sintomi clinici (presenti nell'80% dei pazienti alla diagnosi) è un fattore prognosticamente sfavorevole e comunque tradisce, nella maggior parte dei casi, l'esistenza di una neoplasia avanzata per lo più non suscettibile di intervento resettivo radicale⁹.

L'epidemiologia dei carcinomi polmonari è strettamente legata alla diffusione di quello che ne costituisce il principale fattore di rischio ovvero il fumo di sigaretta. Il rischio di tumore dipende sia dal numero di sigarette fumate al giorno, sia dall'età di inizio, sia dalla durata dell'abitudine al

fumo. All'esposizione a fumo passivo (FP) è stato invece associato un rischio di carcinoma polmonare tra il 20% ed il 30% per esposizione domestica, mentre all'esposizione in ambito lavorativo sono associati rischi tra il 16% ed il 19%. L'evidenza è sufficiente per classificare il FP come cancerogeno per l'uomo ¹⁰. Anche l'esposizione professionale a elementi carcinogenici quali l'asbesto, il radon, effluvi di idrocarburi policiclici, cromo, nichel e composti dell'arsenico inorganico è stata riconosciuta come fattore di rischio.

1.2. ISTOLOGIA

I carcinomi polmonari possono essere suddivisi in due grandi categorie: i carcinomi non a piccole cellule (NSCLC) che rappresentano il 75-80% dei casi e lo spettro dei tumori neuroendocrini che assommano al rimanente 20-25% ed in cui fa spicco il carcinoma a piccole cellule^{11 12}. A differenza dei carcinomi a piccole cellule, che appaiono relativamente omogenei dal punto di vista morfobiologico, i carcinomi non a piccole cellule sono molto più eterogenei. Sono state proposte differenti classificazioni dei NSCLC, ma attualmente, la più utilizzata è quella dell'Organizzazione Mondiale della Sanità che identifica tre categorie principali:

- Adenocarcinoma (30-40%)
- Carcinoma squamocellulare (25-40 %)
- Carcinoma a grandi cellule (10-15 %)

1.2.1. ADENOCARCINOMA

Gli adenocarcinomi rappresentano oggi l'istotipo prevalente, anche nel sesso femminile e tra coloro che non hanno mai fumato. Sono caratterizzati da ghiandole neoplastiche con variabile produzione di muco disposte a formare acini o tubuli (Figura1) oppure crescono lungo le pareti alveolari a formando i carcinomi bronchioloalveolari (BAC) (Figura2). Il più comune modo di presentazione dell'adenocarcinoma è come nodulo periferico grigiastro in stretta adiacenza della pleura viscerale che appare dapprima ispessita e biancastra, poi retratta, quasi risucchiata all'interno del nodulo con una caratteristica configurazione a "V" ben visibile anche all'esame radiologico. I margini del nodulo più frequentemente spiculati ed irregolari a sfumare nel parenchima polmonare adiacente (espressione macroscopica della presenza di componente BAC). A prescindere dalle modalità di crescita, gli adenocarcinomi polmonari sono neoplasie che metastatizzano frequentemente per via linfatica (almeno nel 50% dei casi) ai linfonodi loco-

regionali od ematica (20% dei casi) a fegato, osso, sistema nervoso centrale e surreni, oppure si diffondono per via aerogena con gettoni neoplastici veicolati dal flusso dell'aria respirata nello stesso polmone o in quello controlaterale (tipico dei BAC). Il più frequente sottotipo istologico è l'adenocarcinoma misto che rappresenta almeno il 75-80% di tutti gli adenocarcinomi polmonari resecati, in cui le cellule neoplastiche si dispongono in strutture acinari, papillari, in ammassi solidi o con crescita BAC, mentre alquanto più rare sono le rispettive forme pure ¹³.

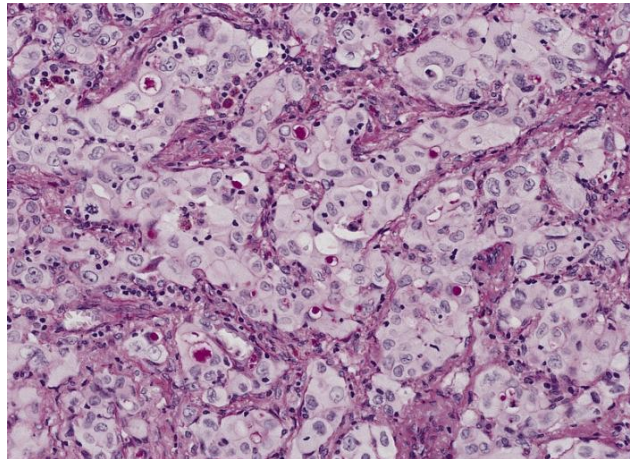


Figura 1. Adenocarcinoma polmonare solido scarsamente differenziato: notevoli vacuoli di mucina nelle cellule neoplastiche.

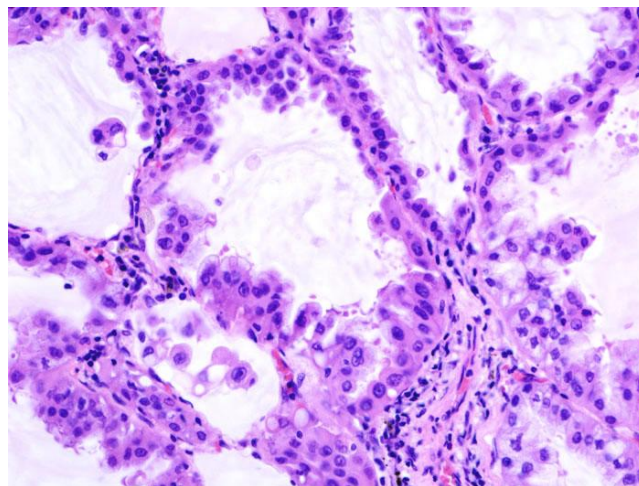


Figura 2. Adenocarcinoma polmonare bronchioloalveolare: cellule neoplastiche tappezzano i setti interalveolari rispettandone la struttura.

1.2.2. CARCINOMA A CELLULE SQUAMOSE

Circa il 70% dei carcinomi squamosi si sviluppano come lesioni ilari o parailari dall'epitelio dei grossi bronchi prossimali, mentre solo il 30% si presenta come lesione più periferica a partire dai bronchi segmentari, subsegmentari e terminali. I tumori centrali originano come lesioni *in situ* che sostituiscono estesamente l'epitelio di superficie e delle ghiandole siero-mucose bronchiali, infiltrano la parete bronchiale con variabile sviluppo laterale (*creeping type*) o crescono come lesioni polipoidi endoluminali con precoce invasione profonda della parete bronchiale (*penetrating type*) (Figura3). I tumori periferici formano una massa solida con crescita nodulare endobronchiale, estensione intraepiteliale, ma precoce coinvolgimento del parenchima polmonare e, nei casi più avanzati, della pleura viscerale, della parete toracica e del diaframma. Una parte di essi (circa il 20% delle lesioni in stadio iniziale) rimane comunque limitata alla parete bronchiale e mostra un andamento clinico particolarmente favorevole con lunga aspettativa di vita quando paragonata ai tumori iniziali con estensione parenchimale ¹⁴. La storia naturale dei carcinomi squamosi del polmone vede un progressivo sviluppo locale con inglobamento sequenziale delle strutture anatomiche adiacenti. Tumori scarsamente differenziati possono metastatizzare precocemente ai linfonodi mediastinici, ai surreni, al sistema nervoso centrale ed al tratto gastrointestinale. Istologicamente, i carcinomi squamosi sono costituiti da grandi cellule poligonali con abbondante citoplasma contenente filamenti di citocheratine e ponti intercellulari (dovuti alla presenza di desmosomi) e da strutture a vortice costituite da ammassi di cellule cheratinizzanti (perle cornee) (Figura3). Dal punto di vista prognostico, i pazienti con carcinoma squamoso hanno complessivamente una sopravvivenza migliore, a parità di stadio, rispetto agli adenocarcinomi, ai carcinomi a grandi cellule ed ai carcinomi a piccole cellule, anche se questo dato non è confermato in tutti gli studi ¹⁶. Sono stati recentemente proposti alcuni fattori genetici predittivi di comportamento clinico o di risposta alla terapia ma ulteriori studi sono necessari per trasferire queste acquisizioni nella realtà clinica ^{15 16}.

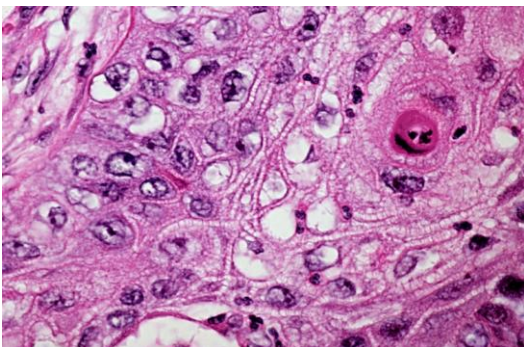


Figura 3. Carcinoma polmonare squamocellulare: cellule con citoplasma intensamente eosinofilo dalle quali protrudono spine che permettono il contatto tra le cellule.

1.2.3. CARCINOMA A GRANDI CELLULE

I carcinomi a grandi cellule sono una categoria eterogenea di carcinomi del polmone, per definizione scarsamente differenziati, di cui si conoscono diverse varianti accomunate dalla mancanza di attributi differenziativi riconducibili agli adenocarcinomi o ai carcinomi squamosi³³. Essi rappresentano circa il 10% di tutti i carcinomi del polmone, colpiscono maschi con un'età media di 60 anni e sono in larga parte associati al fumo. I carcinomi a grandi cellule sono generalmente lesioni periferiche in variabile rapporto con le strutture bronchiali, con l'eccezione della variante basaloide che tipicamente è una lesione centrale con crescita endobronchiale esofitica. La variante classica è la forma più frequente di carcinoma a grandi cellule, è formata da larghe cellule poligonali con nucleo vescicoso, prominente nucleolo e moderato ammontare di citoplasma: è sostanzialmente una diagnosi di esclusione dopo aver eliminato con un adeguato campionamento la possibilità che esista una componente di adenocarcinoma, di carcinoma squamoso o di carcinoma a piccole cellule. In realtà, quando esaminati al microscopio elettronico, la maggior parte dei carcinomi a grandi cellule è riconducibile agli istotipi più usuali di carcinoma non a piccole cellule del polmone. La prognosi dei carcinomi a grandi cellule di tipo classico è generalmente peggiore rispetto ai comuni carcinomi non a piccole cellule anche stratificata per stadio²⁶, ma migliore rispetto ai carcinomi basaloidei, al carcinoma neuroendocrino a grandi cellule puro o combinato ed al carcinoma a grandi cellule con fenotipo rabdoide^{17 18} (Figura 4).

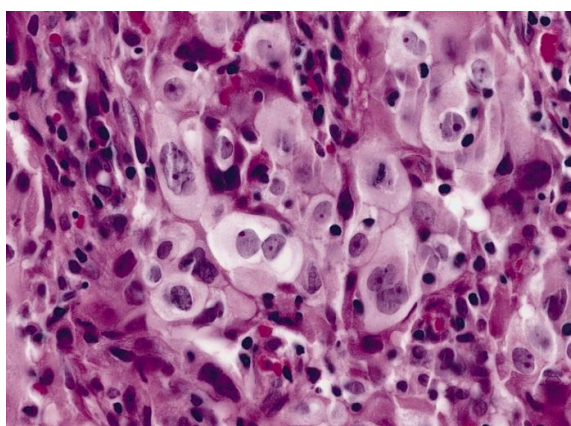


Figura 4. Carcinoma polmonare a grandi cellule: presenza di atipie nucleari, nucleolari e citoplasmatiche che rendono il quadro istologico notevolmente pleomorfo.

1.2.4. MICROCITOMA (CARCINOMA POLMONARE A PICCOLE CELLULE)

Il microcitoma è il carcinoma polmonare caratterizzato dalla più alta malignità e da un particolare fenotipo neuroendocrino ¹⁹. Rappresenta il 20% di tutti i tumori polmonari e solo il 6% circa dei pazienti supera in vita, il quinto anno al momento della diagnosi (Figura 5). Nel microcitoma vi è una presenza nettamente superiore di sindromi paraneoplastiche legate alla produzione di ormoni peptidici o alla produzione di auto-anticorpi. Da ciò deriva che i quadri clinici del microcitoma sono fondamentalmente di tipo endocrino o neurologico; tra le prime l'ipercalcemia, un'elevata e alterata produzione di ormone antidiuretico o di ormone adrenocorticotropo; tra le sindromi di tipo neurologico, alcune a livello centrale (degenerazione cerebellare), alcune forme periferiche e la retinopatia. Il microcitoma ha la più elevata velocità di crescita di tutti i tumori del polmone: il tempo di raddoppiamento, testato con indagini radiografiche, si aggira sui novanta giorni. Da un punto di vista diagnostico si differenzia in parte dagli altri tipi di tumore poiché l'esordio clinico è spesso accompagnato alla presenza di metastasi a distanza dal polmone ^{20 21}.

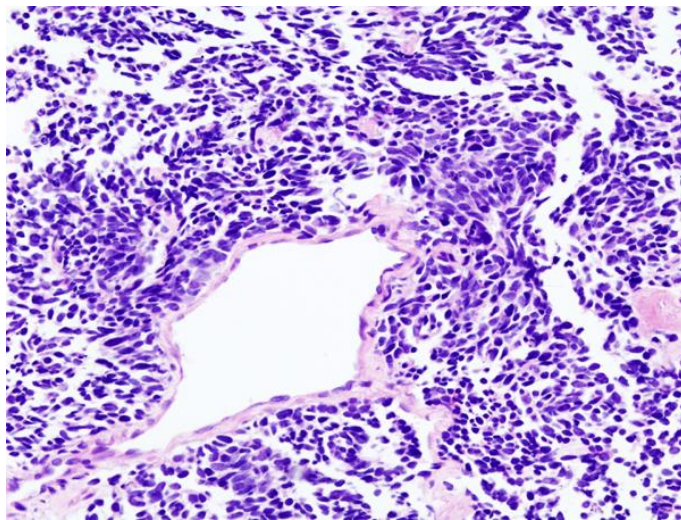


Figura 5. Biopsia di carcinoma polmonare a piccole cellule: gruppi cellulari con scarso citoplasma e cromatina finemente dispersa.

1.3. STADIAZIONE E PROGNOSI

Per il NSCLC la classificazione si basa sul TNM, ove per T, N, M si intende:

- 1) T: dimensione e/o estensione locale del tumore primitivo.
- 2) N: interessamento linfonodale, cioè la presenza di cellule maligne nei linfonodi.
- 3) M: presenza di metastasi (ovvero organi solidi in cui ci sia evidenza di cellule di derivazione polmonare). I siti più frequenti di metastasi da carcinoma polmonare sono: encefalo, surreni (piccole ghiandole localizzate sopra i reni), fegato, ossa.

Per "T" si riconoscono quattro livelli:

T1: tumore uguale o inferiore a 3 cm senza interessamento della pleura viscerale e/o del bronco principale.

T2: tumore di dimensioni maggiori a 3 cm oppure di qualunque dimensione che però sia localizzato a 2 cm dalla carena tracheale, o che coinvolga al pleura viscerale, o provochi atelettasia polmonare.

T3: qualunque dimensione purché infiltri la parete toracica, il diaframma, la pleura mediastinica, dia atelettasia di un intero polmone o sia entro 2 cm dalla carena tracheale.

T4: qualunque tumore che invada il mediastino, il cuore o i grossi vasi, la trachea o il corpo vertebrale, la carena, che presenti noduli multipli in uno stesso lobo e/o versamento pleurico.

Per "N" si riconoscono quattro livelli:

N0: non evidenza di metastasi linfonodali.

N1: metastasi a carico dei linfonodi bronchiali o ilari omolaterali al tumore primitivo.

N2: metastasi a carico dei linfonodi mediastinici e carinali omolaterali.

N3: metastasi a carico dei linfonodi ilari, mediastinici e carinali controlaterali o sovraclaveari.

Per "M" si riconoscono due livelli:

M0: non evidenza di metastasi a distanza.

M1: presenza di metastasi a distanza.

La combinazione dei diversi T, N ed M determina la stadiazione.

Quelli sotto riportati corrispondono alla suddivisione nei 4 stadi principali con i rispettivi sottotipi.

Stadio Ia: T1N0M0

Stadio Ib: T2N0M0

Stadio IIa: T1N1M0

Stadio IIb: T2N1M0; T3N0M0

Stadio IIIa: T1N2M0; T2N2M0; T3N1M0

Stadio IIIb: qualsiasi T N3M0; T3N2M0; T4 qualsiasi N M0.

Stadio IV: qualsiasi T, qualsiasi N, M1.

La prognosi viene basata sul tipo istologico e sullo stadio del tumore . Nelle forme di carcinoma polmonare non a piccole cellule la sopravvivenza dipende soprattutto dallo stadio (Tabella 1), benché debba essere sempre considerata la presenza di patologie concomitanti e l'indice di Karnofsky calcolato per il paziente in osservazione.

Tabella 1 Curve di sopravvivenza percentuale a 5 anni basate sulla stadiazione dei tumori del polmone non a piccole cellule.

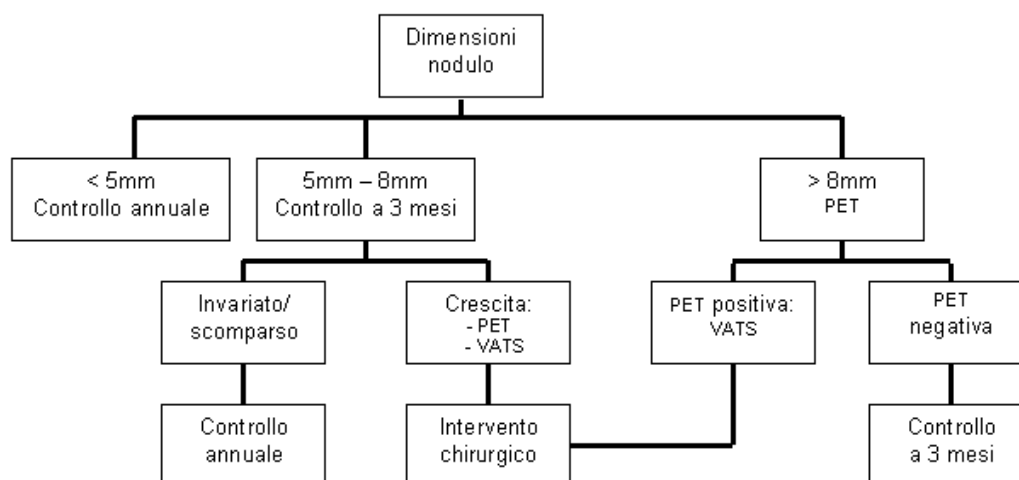
Stadio	TNM	Sopravvivenza a 5 anni dopo chirurgia
IA	T1, N0, M0	60-70%
IB	T2, N0, M0	38-50%
IIA	T1, N1, M0	34%
IIB	T2, N1, M0 T3, N0, M0	22-24%
IIIA	T1, N2, M0 T2, N2, M0 T3, N1-2, M0	9-13%
IIIB	Ogni T, N3, M0 T4, ogni N, M0	3-7%
IV	Ogni T, ogni N, M1	1%

Solo il 20% dei pazienti presenta la malattia ad uno stadio I e il 5% al livello II. Molti pazienti si presentano con una malattia localmente avanzata (stadio III) o metastatica (stadio IV).

1.4. STRATEGIA DIAGNOSTICA

Molti studi hanno dimostrato come la radiografia standard del torace e l'esame dell'espettorato nella popolazione ad alto rischio non soddisfino i requisiti primari di un test di *screening*^{22 23}. Allo stato attuale, la Tomografia Computerizzata spirale multidetettore (TC), con l'applicazione di protocolli a basso dosaggio, si è imposta come la metodica d'elezione per la diagnosi precoce delle neoplasie polmonari. Nell'ottica di ridurre il rapporto costo-beneficio del test, lo *screening* dei tumori polmonari prevede l'applicazione di protocolli a basso dosaggio (*Low-dose TC*) per limitare l'esposizione del paziente. La tecnica a basso dosaggio assicura comunque una buona risoluzione spaziale e una buona risoluzione ad alto contrasto, garantendo alta sensibilità nel riscontro di noduli polmonari anche di pochi millimetri^{24 25}. L'introduzione di TC multidetettore con possibilità di ricostruzione a strati sottili, ha comportato un incremento dei noduli rilevati^{26 27} che impone necessariamente un algoritmo diagnostico per la loro gestione. Il processo decisionale richiede la valutazione di tutti gli elementi in possesso. Tra questi, le dimensioni iniziali e la crescita del nodulo costituiscono i parametri decisionali più importanti^{28 29}. Nonostante non sia attualmente suffragato da evidenze cliniche, risulta largamente accettato che i noduli inferiori a 5 mm non siano meritevoli di controlli a breve distanza di tempo, ma vengano monitorati annualmente³⁰. Fondamentale è la valutazione della morfologia del nodulo (solido, parzialmente solido, non solido), in relazione alla capacità di oscurare il parenchima polmonare³¹. Nessuna caratteristica morfologica considerata isolatamente può aiutare a stabilire la natura benigna o maligna di una lesione; tuttavia, valutati nel loro insieme, i segni morfologici sono fondamentali nell'orientamento diagnostico. Tra questi, devono essere tenuti in considerazione i contorni della lesione, presenza di cavitazioni, broncogramma aereo, calcificazioni e connessioni pleuriche^{32 33 34}. Nel riscontro di un nodulo ritenuto sospetto, il completamento diagnostico esige controlli nel tempo e l'integrazione di tecniche di medicina nucleare (PET o TC/PET)³⁵, *enhancement* contrastografico TC^{36 37}, biopsie/agoaspirati percutanei³⁸ e/o chirurgici, rendendo pertanto indispensabile un approccio multidisciplinare. Diversi autori hanno suggerito altrettanti protocolli per la gestione dei noduli diagnosticati^{39 40}.

Di seguito, è proposto un possibile algoritmo diagnostico:



1.5. TERAPIA

La terapia del carcinoma polmonare dipende dal tipo cellulare, dall'estensione della malattia e dalle condizioni di salute del paziente. I trattamenti comuni includono chirurgia, chemioterapia e radioterapia.

1.5.1. CHIRURGIA

Una volta confermata la presenza di neoplasia, la tomografia computerizzata e ad emissione di positroni sono strumenti necessari per la valutazione di *resecabilità* del tumore (eliminazione della maggior quantità possibile di tumore), condizionata dall'estensione, dall'infiltrazione degli organi vicini e dalla presenza di metastasi. Elementi che invece influenzano la sopravvivenza e qualità di vita del paziente in seguito all'operazione sono gli esami del sangue e la spirometria: mentre i primi possono indicare la presenza di comorbidità come il diabete, l'insufficienza respiratoria o l'insufficienza renale, la spirometria è in grado di valutare in maniera semplice e rapida la presenza di gravi bronco pneumopatie cronico ostruttive (BPCO), condizione che rappresenta una notevole limitazione alla chirurgia. La chirurgia toracica (con accesso toracotomico) per il carcinoma polmonare ha un tasso di mortalità totale del 4,4%, strettamente correlato alla funzione polmonare e alla presenza di altri fattori di rischio⁴¹. La chirurgia rappresenta il primo presidio terapeutico nei NSCLC confinati ad un polmone e fino allo stadio IIIa⁴² (la stadiazione si assegna pre-operatoriamente attraverso la tomografia computerizzata e ad emissione di positroni).

Le procedure chirurgiche comprendono la wedge resection (rimozione del tessuto neoplastico e di piccola parte del parenchima polmonare che lo circonda), la segmentectomia (rimozione di una sezione di parenchima ventilato da un bronco segmentale), la lobectomia (rimozione di un lobo intero), la bilobectomia (rimozione di due lobi) e la pneumonectomia (rimozione dell'intero polmone). Nei pazienti con riserva funzionale adeguata, la lobectomia costituisce l'opzione di scelta, in quanto minimizza la possibilità locale di recidiva. Nei pazienti che non hanno un'adeguata riserva funzionale, la wedge resection costituisce una valida alternativa ⁴³. La brachiterapia con frammenti di iodio applicata ai margini dell'escissione wedge può ridurre il tasso di recidiva con risultati comparabili alla lobectomia ⁴⁴. La chirurgia toracica video assistita (*VATS = Video-Assisted Thoracic Surgery*) (approccio mini-invasivo) e le procedure di lobectomia condotte con questo metodo possono presentare vantaggi nel più rapido recupero post-operatorio, e quindi in una riduzione dei costi ⁴⁵.

1.5.2. CHEMIOTERAPIA

La chemioterapia rappresenta il primario approccio terapeutico in caso di NSCLC metastatico. Spesso i carcinomi non a piccole cellule vengono trattati con cisplatino o carboplatino in combinazione con gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, etoposide o vinorelbina ⁴⁶.

1.5.3. CHEMIOTERAPIA ADIUVANTE

Questo termine indica l'uso di chemioterapia in associazione contemporanea con altre terapie, come la chirurgia e la radioterapia. Durante le procedure chirurgiche devono essere prelevati i linfonodi; se in seguito all'esame istologico risultassero positivi per presenza di cellule neoplastiche, il tumore viene classificato in stadio II o III (in base al gruppo colpito). In questa situazione, la chemioterapia adiuvante può incrementare il tasso di sopravvivenza del 15% ^{47 48}, soprattutto se vengono usati farmaci contenenti platino, come il cisplatino e il carboplatino ⁴⁹.

L'uso di questo schema chemioterapico nei pazienti in stadio Ib (tumore di dimensione massima superiore a 3 cm; assenza di metastasi ai linfonodi loco regionali; assenza di metastasi a distanza) è invece controverso, poiché i trials clinici non hanno ancora dimostrato un beneficio in termini di sopravvivenza ^{50 51}. I trials di valutazione in termini di sopravvivenza per la chemioterapia pre-operatoria (chemioterapia neoadiuvante) nei tumori completamente resecabili non sono stati ad oggi conclusivi ⁵².

1.5.4. RADIOTERAPIA

La radioterapia è spesso associata alla chemioterapia nei pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule che non possono essere sottoposti all'intervento chirurgico. Questa forma di radioterapia è chiamata *radioterapia radicale*⁵³. Un perfezionamento di questa tecnica è la radioterapia continua accelerata iperfrazionata (CHART), nella quale viene somministrata un'elevata dose in un breve periodo di tempo. L'uso della radioterapia adiuvante per i NSCLC è ancora controverso, benché diversi benefici siano stati documentati nei tumori con coinvolgimento dei linfonodi mediastinici^{54 55}.

Per i pazienti con NSCLC la radioterapia può essere usata per il controllo del dolore e dei sintomi attraverso piccole dosi di radioterapia (radioterapia palliativa).

La brachiterapia (radioterapia localizzata) può avere un effetto diretto nei tumori confinanti ad una piccola sezione di bronco⁵⁶. Può essere inoltre usata quando un tumore inoperabile causa l'ostruzione di una via aerea di grandi dimensioni⁵⁷.

1.5.5. TERAPIE BIOLOGICHE E TARGET THERAPY

Nel corso degli ultimi anni si è registrato lo sviluppo di nuove molecole in grado d'interferire in maniera selettiva con la cellula tumorale, bloccandone la proliferazione. Questi nuovi farmaci, definiti "biologici" in quanto indirizzati verso *target* molecolari specifici diversi da quelli tradizionali della chemioterapia, in esperienze precliniche hanno dimostrato interazioni favorevoli con le chemioterapie classiche. Benché tali farmaci agiscano prevalentemente con un meccanismo citostatico e non citotossico, la capacità di interferire con i processi di proliferazione cellulare ed antiapoptotici fa sì che, nei pazienti sensibili, la regressione della malattia risulti più rapida di quanto comunemente osservato con la chemioterapia tradizionale. Sono stati studiati numerosi agenti biologici nel carcinoma polmonare non a piccole cellule, ma al momento, la classe di farmaci che ha trovato un ruolo nella terapia della malattia in fase avanzata è rappresentata dalle molecole che interferiscono con l'attività dei recettori di membrana (recettori della famiglia di EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*).

Le strategie terapeutiche utilizzate per impedire il funzionamento di EGFR includono agenti in grado di bloccare il dominio extracellulare recettoriale o piccole molecole che interferiscono con il processo di attivazione intracellulare del recettore, denominate inibitori delle tirosino-chinasi.

Tra i farmaci inibitori di EGFR, quelli già utilizzati nella pratica clinica sono *gefitinib* (Iressa, ZD1839) ed *erlotinib* (Tarceva) in grado di bloccare l'attività tirosino-chinasica del dominio intracellulare di EGFR (Figura6).

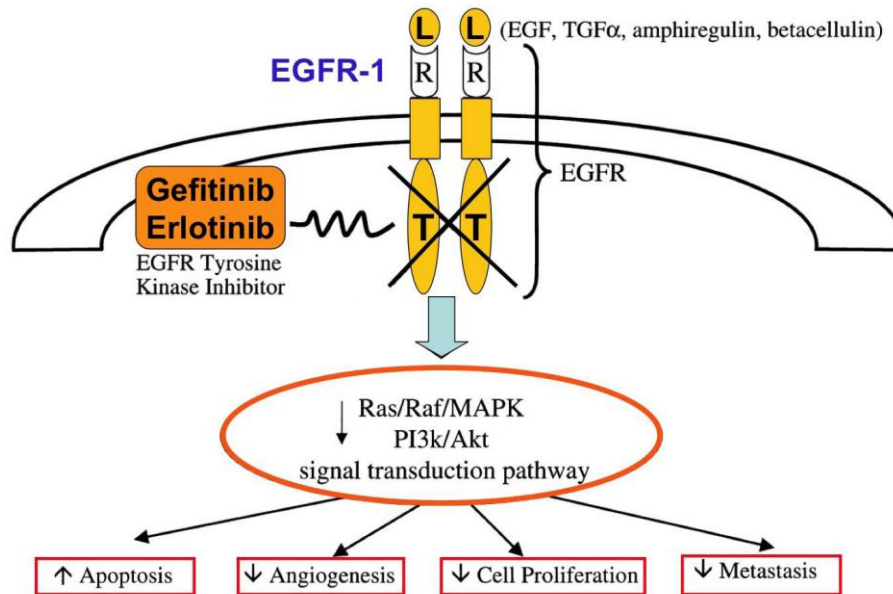


Figura 6. *Gefitinib* ed *erlotinib* bloccano l'attività tirosino-chinasica del dominio intracellulare di EGFR.

Gefitinib è stato la prima molecola bloccante l'attività dei recettori tirosin-chinasici ad essere testata su pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule, della testa-collo, della prostata e della mammella al fine di determinare la dose massima tollerata e la dose più opportuna da somministrare^{58 59 60} (Figura7).

Gefitinib, prodotto dalla casa farmaceutica Astra Zeneca, è stato approvato dalla FDA nel maggio 2003: viene somministrato oralmente con dose giornaliera di 250 mg in pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule progredito o che non abbiano risposto a un precedente trattamento chemioterapico con cis-platino e taxotere. Sono in corso al momento studi per valutarne l'applicabilità ad altre neoplasie, quali colonretto e mammella.

Erlotinib invece, prodotto dalla casa farmaceutica Roche, è stato approvato dalla FDA nel novembre del 2004 per il trattamento di pazienti con tumore polmonare non a piccole cellule in stadio avanzato che sia progredito ad almeno una precedente linea di chemioterapia.

In pazienti pretrattati con chemioterapia, tradizionalmente refrattari a qualsiasi ulteriore trattamento medico, tali farmaci hanno prodotto una percentuale di risposte obiettive vicina al 10%, con un miglioramento clinico ed un arresto nella progressione di malattia nel 30-40% dei

casi, anche se con effetti indesiderati quali nausea, vomito, diarrea e rash cutanei, risolvibili a fine trattamento.

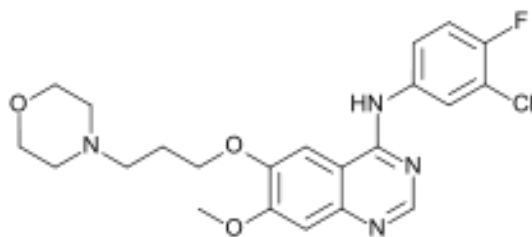


Figura 7. Struttura molecolare del Gefitinib.

L'erlotinib in un recente studio randomizzato è stato in grado di ottenere un miglioramento della sopravvivenza statisticamente significativo, quando confrontato con placebo ⁶¹. Questi risultati hanno favorito in Italia la sua registrazione per il trattamento di seconda e terza linea del carcinoma polmonare non a piccole cellule. In prima linea, erlotinib e gefitinib sono stati utilizzati in studi randomizzati, in associazione alla chemioterapia senza però dimostrare un beneficio in termini di sopravvivenza, probabilmente per l'assenza di un'adeguata selezione dei pazienti ⁶². Infatti, alla data di attivazione di questi studi non erano ancora conosciuti i fattori clinici e biologici predittivi di sensibilità a questa classe di farmaci. Oggi è noto che un trattamento biologico di prima linea può aver senso solo in presenza di un adeguato profilo clinico e di un preciso assetto clinico-molecolare. Fra le caratteristiche cliniche, la non esposizione al fumo di sigaretta è sicuramente il fattore più rilevante, come confermato dal vantaggio in termini di sopravvivenza osservato in studi di fase III. Fra le caratteristiche biologiche, l'attenzione dei ricercatori si è concentrata, logicamente, sul bersaglio di gefitinib ed erlotinib, ovvero su EGFR (Tabella 2).

Sin dalla loro identificazione, avvenuta nel 2004, le mutazioni di EGFR si sono rivelate il più importante fattore predittivo per la risposta agli EGFR-TKI. I primi studi hanno dimostrato che le mutazioni di EGFR sono somatiche e si osservano più comunemente in pazienti con le caratteristiche cliniche predittive per la sensibilità a gefitinib, ovvero nei non fumatori, nelle donne, negli adenocarcinomi e nei pazienti asiatici ^{63 64}.

Tabella 2. Fattori predittivi per la sensibilità agli inibitori delle tirosin-chinasi*

	Fattori predittivi per migliore risposta	Fattori predittivi per migliore sopravvivenza
Clinici	<ul style="list-style-type: none">• Sesso femminile• Adenocarcinoma• Non esposizione al fumo• Etnia asiatica	<ul style="list-style-type: none">• Non esposizione al fumo• Risposta alla precedente terapia• <i>Performance status</i>• Adenocarcinoma• Pregressa terapia con platino• Rash cutaneo• Etnia asiatica
Biologici	<ul style="list-style-type: none">• Mutazione EGFR• Polisomia/amplificazione EGFR• Polisomia/amplificazione HER2• Attivazione AKT	<ul style="list-style-type: none">• Polisomia/amplificazione EGFR

1.6. EGFR: MARCATORE MOLECOLARE PREDITTIVO DI SENSIBILITA' AL TRATTAMENTO CON INIBITORI DEI RECETTORI TIROSIN-CHINASICI

I recettori tirosin-chinasici (o *receptor tyrosine kinase*, RTK) sono proteine di membrana aventi attività chinasiche, e agiscono fosforilando residui di tirosina nella proteina bersaglio. Le proteine recettoriali tirosin-chinasiche sono costituite da un dominio extracellulare (di circa 50-80 kD) che possiede un sito di legame per il ligando specifico, un dominio citoplasmatico (che può variare dai 150 ai 350 kD) che possiede un sito di attacco per l'adenosintrifosfato (ATP) e un secondo dominio citoplasmatico con cui riconosce specifiche sequenze delle proteine bersaglio. La regione transmembrana è costituita da una singola alfa elica idrofobica che attraversa la membrana. Il sito attivo invece è costituito da una breve ansa, che forma una piccola apertura in fondo alla quale si trova il sito di legame per l'ATP. Adiacente al sito attivo vi è una sequenza, indicata col nome di *labbro di fosforilazione*, che possiede alcuni residui di tirosina la cui fosforilazione è fondamentale per l'attività chinasiche della proteina.

L' Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) è una proteina di membrana di 170 KDa codificata da un gene di 28 esoni localizzato sul cromosoma 7 in 7p12. I ligandi degli RTK sono molecole solubili o più spesso ormoni peptidici. Tra i ligandi troviamo numerosi fattori di crescita come il fattore di crescita dell'epidermide (epidermal growth factor, EGF), il fattore di crescita derivato dalle piastrine (platelet-derived growth factor, PDGF) e molti altri. Allo stato inattivo i recettori tirosin-chinasici si trovano in forma monometrica ancorati alla membrana cellulare. Il legame con queste molecole porta all'attivazione del recettore, che omodimerizza con un altro recettore EGFR od eterodimerizza con altre proteine della famiglia dei recettori per il fattore di crescita epiteliale^{65 66}

come HER2/c-neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) e Her 4 (ErbB-4). Il partner più frequente di EGFR è rappresentato da HER2/c-neu⁶⁷ (Figura 8).

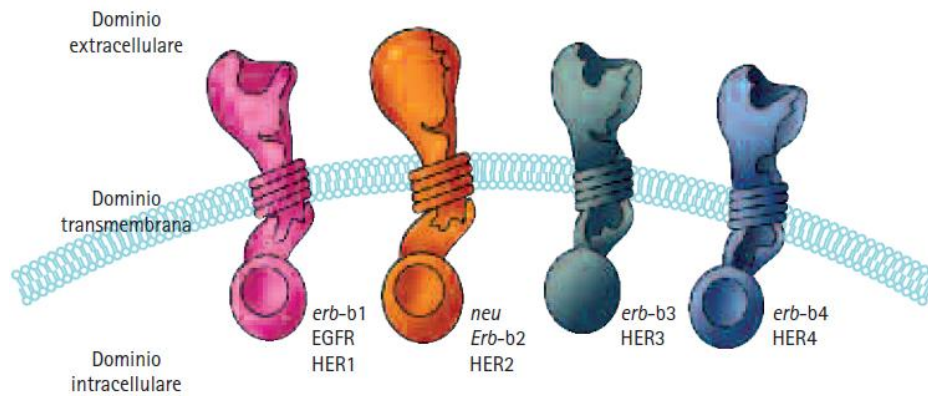


Figura 8. La famiglia di EGFR: 4 differenti recettori in cui si distinguono 3 domini: dominio extracellulare, che, a eccezione di HER2, interagisce con uno specifico ligando; dominio transmembrana; dominio intracellulare, che, fatta eccezione per HER3, è dotato di attività tirosin-chinasica.

La omo-eterodimerizzazione porta all'avvicinamento dei domini citoplasmatici dei suddetti recettori; tali domini possiedono un'attività tirosin-chinasica, che innesca la vicendevole autofosforilazione di numerosi residui di tirosina localizzati nel dominio C-terminale del recettore, tra cui Y992, Y1045, Y1068, Y1148 e Y1173⁶⁸. Questa autofosforilazione attiva la cascata di trasduzione del segnale a valle, reclutando differenti proteine che si associano alle tirosine fosforilate grazie ai propri domini di legame SH2 (Figura9).

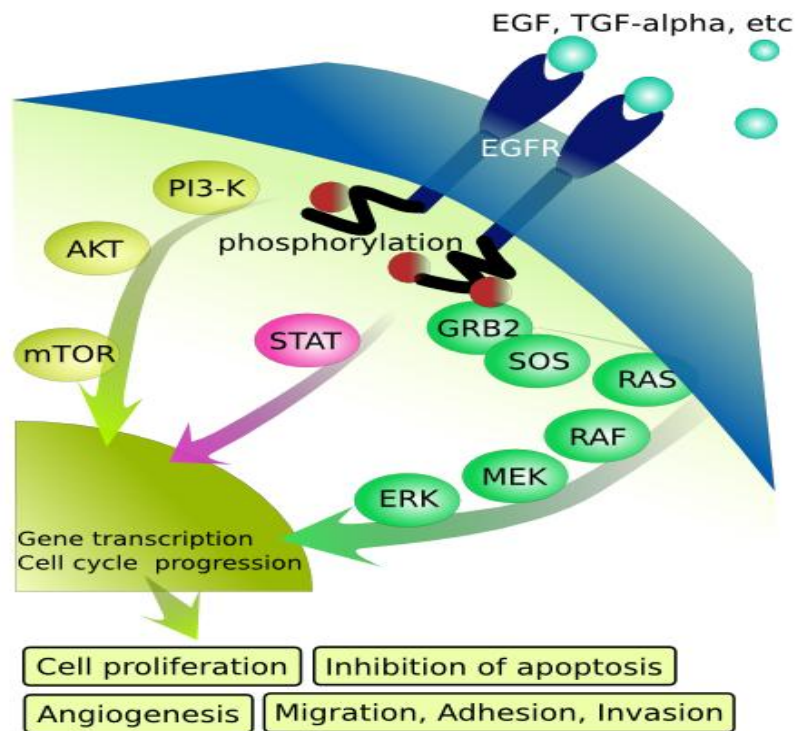


Figura 9. Principali vie di trasduzione del segnale dipendenti dall'attivazione di EGFR.

Le due principali vie di trasduzione del segnale, che vengono innescate in seguito all'attivazione dei recettori tirosin-chinasici, sono il pathway della chinasi Akt e JNK, coinvolto nella regolazione dell'apoptosi e la cascata delle MAP chinasi (MAPK), importanti nella regolazione della proliferazione cellulare. Il reclutamento di queste proteine determina il fenotipo cellulare attraverso il controllo di meccanismi quali migrazione, adesione e proliferazione⁶⁹.

La chinasi Akt è una proteina citoplasmatica essenziale per la regolazione della sopravvivenza cellulare, del ciclo cellulare, del metabolismo cellulare e dell'angiogenesi. Quando EGFR lega il suo ligando specifico e si attiva, a livello della membrana plasmatica viene richiamata la chinasi PI3K, che fosforila in posizione 3' i fosfolipidi di membrana, i quali reclutano Akt fosforilandola e attivandola. Akt attiva si distacca dalla membrana e migra nel nucleo dove regola la trascrizione di geni chiave per la progressione del ciclo cellulare (E2F) e di geni antiapoptotici (Bcl-2). Inoltre Akt fosforila la proteina proapoptotica BAD, a livello del residuo Ser136, provocandone la dissociazione dal complesso Bcl-2/Bcl-x e la perdita della sua funzione. In questo modo, fosforilando anche le caspasi, Akt è in grado di inibire l'apoptosi⁷⁰.

L'altra via fondamentale derivante dall'attivazione di EGFR è la cascata delle MAP chinasi: quando il recettore si autofosforila su residui di tirosina, vengono resi accessibili domini citoplasmatici di legame che permettono l'interazione con proteine che innescano la cascata delle MAPK. La

proteina Grb2 lega EGFR attraverso i domini SH2 e la proteina Sos attraverso i domini SH3. Sos è una piccola proteina citoplasmatica appartenente alla famiglia degli scambiatori della guanina, che una volta legata a Grb2 forma il complesso Grb2-Sos attivo^{71 72}. L'attivazione di Sos promuove la rimozione di GDP da Ras permettendole di legare il GTP e di attivarsi. In seguito alla sua attivazione, Ras diventa più affine per il GTP, perdendo viceversa la capacità di legare il GDP. Questa modificazione è tuttavia rapidamente reversibile in quanto Ras, legandosi con la proteina GAP, diviene in grado di idrolizzare il GTP in GDP, perdendo nuovamente la sua attività. Per questo, l'attività di Ras viene definita pulsatoria. Tuttavia, nel breve periodo di attivazione, Ras è in grado di attivare la via delle MAP chinasi attivando la chinasi RAF⁷³. RAF fosforila e attiva MEK che a sua volta fosforila e attiva ERK. RAF, MEK ed ERK sono tutte proteine serin-treonina chinasi specifiche. L'attivazione seriale di questa cascata porterà rapidamente alla differenziazione e proliferazione cellulare⁷⁴.

EGFR si configura dunque come un proto-oncogene a monte di numerosi possibili bersagli patogenetici la cui alterazione può portare alla loro attivazione in maniera indipendente dai fattori di crescita. A supportare l'eventuale ruolo di EGFR nella progressione neoplastica è la sua frequente alterazione in diversi tipi di neoplasie⁷⁵: il recettore è spesso overespresso nel 14-91% dei carcinomi della mammella, nel 25-77% dei carcinomi del colon, nel 40-80% dei carcinomi del polmone non a piccole cellule, nel 50-90% dei carcinomi renali, nel 40-50% dei glioblastomi e nel 30-50% dei carcinomi del pancreas⁷⁶.

Numerose indagini retrospettive, volte a chiarire i meccanismi che stanno alla base della sensibilità agli inibitori di EGFR, hanno osservato, nella maggior parte dei tumori responsivi, mutazioni di EGFR nel dominio tirosino-chinasico. Nella maggior parte degli studi, la presenza di tali mutazioni è risultata associata anche al prolungamento della sopravvivenza dei pazienti dopo il trattamento⁷⁷. Le mutazioni di EGFR che influenzano la sensibilità al trattamento con gefitini/erlotinib consistono in piccole delezioni " *in frame* " di 9-18 basi nell'esone 19 o mutazioni puntiformi localizzate nell'esone 18 e nell'esone 21 del gene (Figura 10 e 11). Recenti studi suggeriscono che le delezioni nell'esone 19 siano più importanti per la previsione del decorso clinico dopo terapia con inibitori delle tirosino-chinasi⁷⁸. Questo risultato è stato confermato anche attraverso il trial clinico denominato TRIBUTE (Tarceva Responses in Conjunction with Taxol and Carboplatin): di 228 pazienti arruolati 29 (13%) presentano mutazioni in EGFR e tra questi 25 pazienti (86%) hanno delezioni nell'esone 19 o mutazioni puntiformi L858R nell'esone 21⁷⁹.

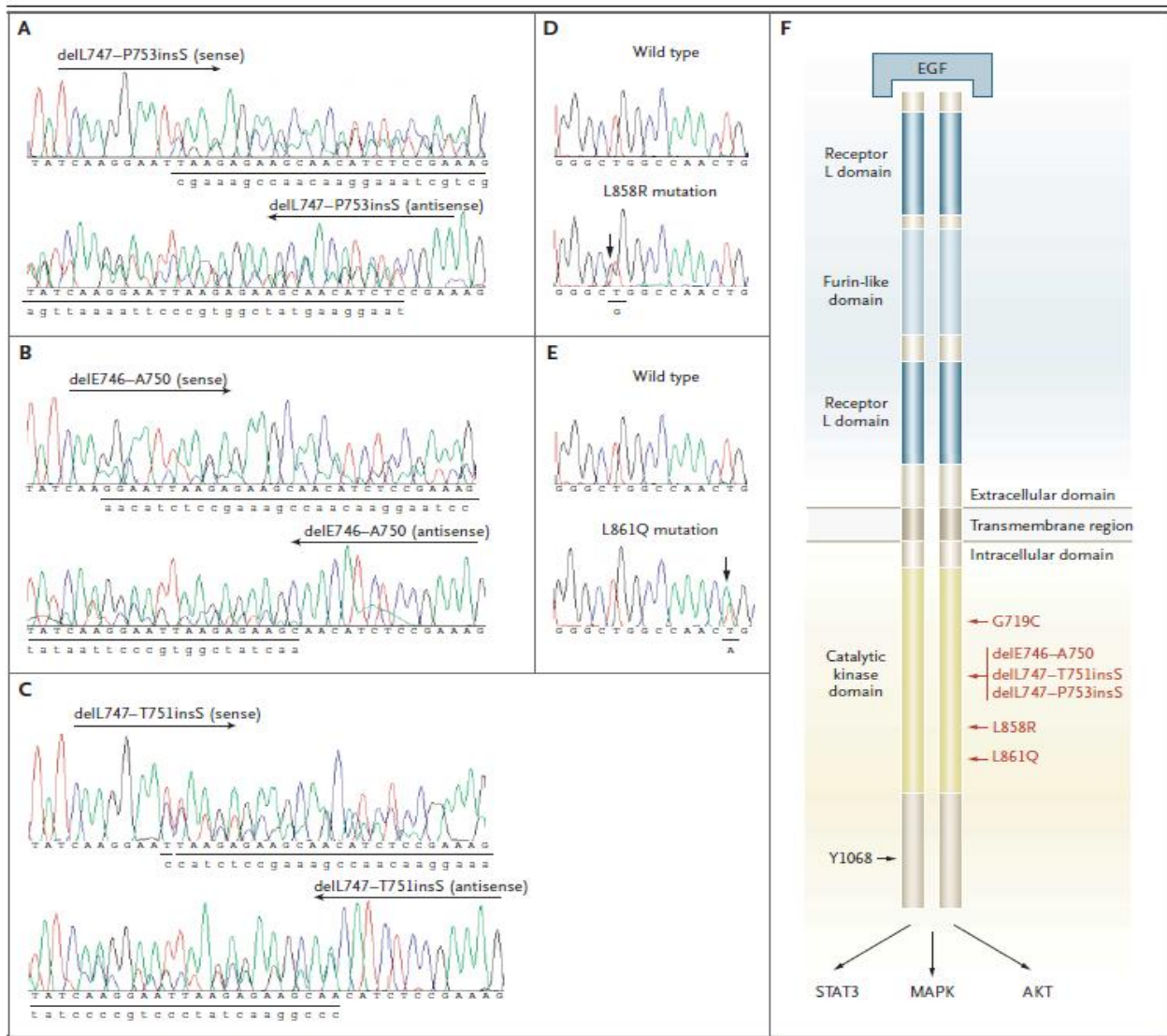


Figura 10. Mutazioni nel gene *EGFR* in tumori responsivi a Gefitinib. Pannelli A, B, e C: sequenza nucleotidica del gene *EGFR* nei campioni tumorali con delezione nell'esone 19. Pannelli D ed E: mutazioni missenso nell'esone 21 di *EGFR*. Pannello F: localizzazioni delle mutazioni nel dimero.

E' stato postulato che le mutazioni di *EGFR* potrebbero determinare un riposizionamento dei residui aminoacidici del dominio tirosin-chinasico del recettore, stabilizzando sia il legame del farmaco sia quello dell'ATP: da qui ne deriva sia l'aumentata attività del recettore mutato in seguito al legame col ligando, sia l'aumentata inibizione mediata da Gefitinib.

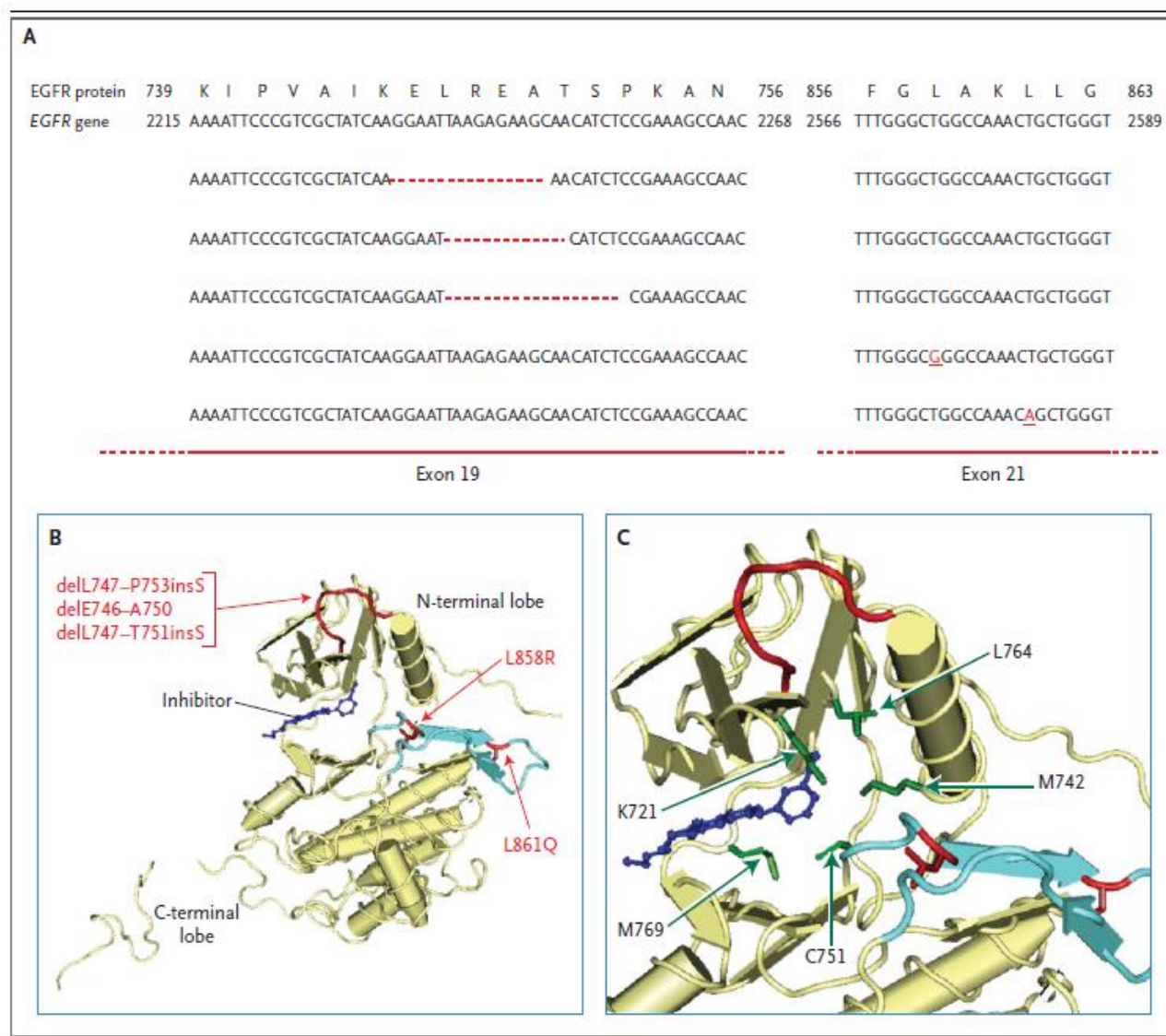


Figura 11. Mutazioni nel gene *EGFR* nei siti critici all'interno della tasca di legame dell'ATP. Pannello A: parziale sequenza nucleotidica degli esoni 19 e 21, (delezione/sostituzione nucleotidica indicata in rosso); Pannello B: struttura tridimensionale del sito di legame EGFR-ATP. L'inibitore (blu scuro), che rappresenta gefitinib, occupa la tasca del legame con ATP. Pannello C: ingrandimento del dominio tirosin chinasi, con gli amminoacidi critici implicati nel legame con ATP o con l'inibitore .

E' stato dimostrato che pazienti trattati con 150mg/die di Erlotinib e con mutazioni a carico degli esoni 19 o 21 di EGFR, presentano una percentuale di risposta al trattamento dell'83%, rispetto a pazienti con EGFR wt con risposta del 7%⁸⁰. Nei pazienti con mutazioni a carico di EGFR aumenta anche il tempo libero da malattia (13 mesi vs 2 mesi).

Le mutazioni di EGFR sono state identificate nell'8-10% dei pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule come indice predittivo di risposta al trattamento con Iressa e quindi posson esser utilizzate in un eventuale screening di pazienti da sottoporre a terapie più mirate⁸¹.

E' stato riportato che frequentemente, nei pazienti trattati con gefitinib o erlotinib si sviluppa nel tempo una resistenza al farmaco, in molti casi attribuibile all'acquisizione, da parte dei tumori, di particolari mutazioni di EGFR che ostacolano l'azione farmacologica. La mutazione T790M a carico dell'esone 20 determina resistenza a entrambi i farmaci. La struttura cristallografica ha rivelato infatti che la posizione T790M si colloca nel sito di legame dell'ATP ed assume quindi un ruolo critico per quanto riguarda il legame di Gefitinib ed Erlotinib al recettore. La sostituzione di una treonina con una metionina al codone 790 comporta problemi di ingombro sterico che impediscono il legame dei due farmaci alla tasca dell'ATP conferendo quindi una mancata risposta terapeutica del paziente⁸². Sono in fase di sviluppo e di validazione nuovi inibitori in grado di agire anche sui tumori che hanno sviluppato resistenza.

Successivi studi hanno individuato la presenza di altri potenziali fattori di sensibilità/resistenza agli inibitori delle TK, come particolari ligandi del recettore e molecole presenti a valle nel signalling di attivazione di EGFR (Figura 12).

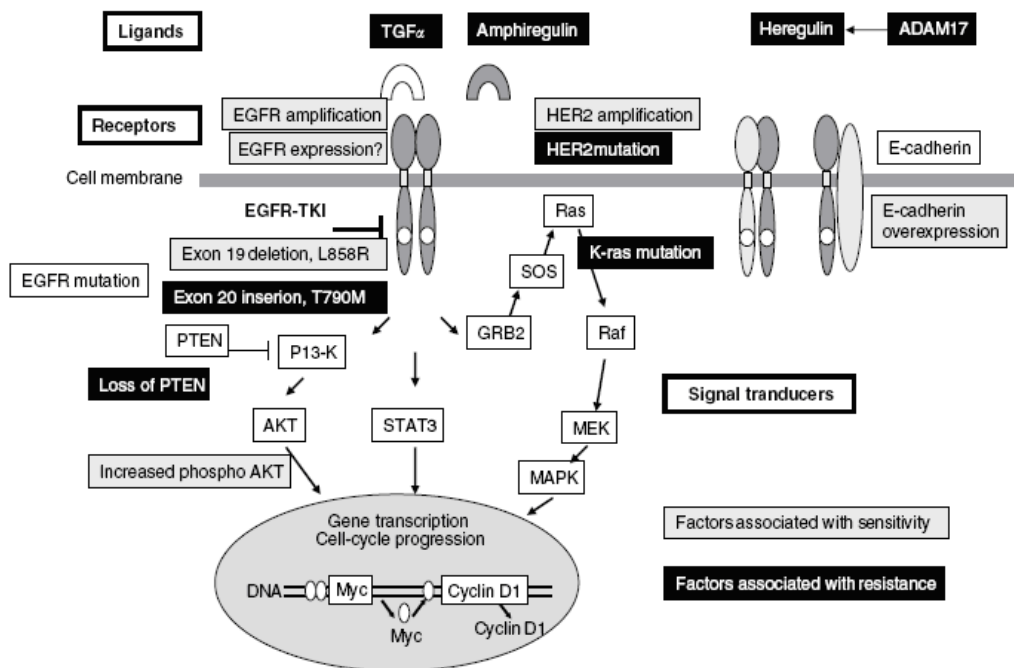


Figura 12. Marcatori molecolari di predittività nella risposta al trattamento con inibitori di EGFR. Adattata da Uramoto 2007

Ad oggi però per la somministrazione di farmaci inibitori tirosin-chinasici, l'unico marcatore necessario è l'analisi mutazionale del gene EGFR.

1.7. METODICHE DI VALUTAZIONE DELLE MUTAZIONI DI EGFR

Negli ultimi anni si è assistito ad un rapido sviluppo tecnologico per l'analisi mutazionale di geni con un ruolo chiave nella determinazione della sensibilità al trattamento con farmaci a bersaglio molecolare. Attualmente accanto alle procedure sviluppate autonomamente in laboratorio si stanno affiancando un numero sempre maggiore di kits commerciali basati su procedure standardizzate e appropriati controlli, allo scopo di rendere queste indagini il più possibile riproducibili, sensibili e specifiche. Lo sviluppo di queste tecnologie è considerato di grande rilievo in un'era ad oggi definita della "Medicina personalizzata" in cui lo sviluppo di farmaci costosi ma mirati a sottogruppi di pazienti con uno specifico assetto genetico ha reso necessario uno sviluppo tecnologico mirato alla selezione dei pazienti potenzialmente sensibili a specifici trattamenti.

Le tecnologie più comunemente utilizzate per identificare la presenza di mutazioni di EGFR sono: il sequenziamento diretto col metodo Sanger, la Real Time e il Pirosequenziamento.

Il sequenziamento del prodotto di PCR secondo il metodo di Sanger è un metodo di screening diretto che consente di conoscere in modo puntuale la successione in basi di un tratto genomico amplificato mediante PCR. Il sequenziamento diretto è la tecnica sicuramente più diffusa e rappresenta il gold standard per evidenziare mutazioni puntiformi o frameshift di EGFR, ma soffre di ridotta sensibilità: una mutazione non può essere evidenziata se presente in meno del 20% delle molecole di DNA analizzate.

La tecnologia della Real-Time PCR permette di monitorare in tempo reale l'accumulo del prodotto di PCR. Si ottiene una curva di amplificazione che deriva da una PCR, ossia il diagramma del segnale di fluorescenza ottenuto rispetto al numero di cicli. L'andamento delle reazioni viene visualizzato in forma di un grafico nel quale per ogni DNA viene rappresentata la fluorescenza (asse y) misurata in ogni ciclo di reazione (asse x). La fluorescenza rilevata rispecchia la concentrazione di amplificato nella reazione. Basandosi quindi su una amplificazione del DNA, questa metodica risulta molto sensibile (rileva una mutazione se presente in meno del 5% delle molecole di DNA analizzate), seppur molto costosa.

Il Pirosequenziamento è un metodo di sequenziamento del DNA alternativo al classico sequenziamento di Sanger, realizzato appositamente per studiare gli SNPs (mutazioni puntiformi o polimorfismi a singolo nucleotide). Il metodo del Pirosequenziamento si basa sul dosaggio del pirofosfato liberato in seguito all'attacco di un dNTP al filamento polimerizzato. Questo passaggio produce il segnale luminoso che viene poi registrato in un apposito pirogramma in cui l'altezza e l'area di ogni picco sono proporzionali all'intensità dell'emissione luminosa e quindi alla quantità

di ATP prodotto. La metodica rivela le mutazioni presenti in meno del 10% delle molecole analizzate.

Nella routine clinica è indispensabile disporre di metodi che consentano di identificare la presenza o meno di mutazioni di EGFR partendo da campioni che contengono un numero limitato di cellule tumorali e un alto numero di cellule normali, metodi che, per esempio, consentano di effettuare l'analisi su citologici. Il problema è di grande rilevanza, dal momento che una percentuale elevata di pazienti ha una diagnosi esclusivamente basata su un citologico.

L'approccio diagnostico e la gestione dei pazienti con adenocarcinoma polmonare è cambiato significativamente con l'avvento degli inibitori tirosin-chinasici. Poiché la determinazione delle mutazioni di EGFR è l'unico marcatore necessario per la somministrazione di questi farmaci, diventa di notevole interesse trovare un approccio di screening delle mutazioni di EGFR semplice e accessibile ad una vasta gamma di laboratori, riducendo al minimo i costi.

Per affrontare questa esigenza, Yu et al. hanno sviluppato due nuovi anticorpi adatti per immunocitochimica in grado di riconoscere le forme mutazionali più frequenti di EGFR di sensibilità alla terapia con inibitori tirosin-chinasici (E746-A750del, L858R)⁸³.

Diversi autori hanno dimostrato che i due anticorpi riconoscono le due mutazioni specifiche di EGFR e che questa metodica rileva una sensibilità variabile dal 40 al 90% rispetto alle metodiche tradizionali, suggerendo un loro utilizzo per l'identificazione dello stato mutazionale di EGFR in campioni tumorali^{84 85}.

Ad oggi non è stato pubblicato nessun lavoro che faccia un confronto tra le diverse metodiche di analisi mutazionale di EGFR che faccia un'analisi approfondita del rapporto qualità/prezzo di ciascuna tecnologia.

1.8. CONTROLLI DI QUALITÀ DI EGFR

1.8.1. CONTROLLO DI QUALITÀ ESTERNO

Negli ultimi anni i test molecolari sono divenuti fondamentali per la scelta della terapia più adeguata, sulla base delle caratteristiche genetiche del paziente (farmacogenetica). L'utilizzo sempre più diffuso di tali test da parte di laboratori sia pubblici che privati, l'ampia varietà di piattaforme disponibili hanno fatto emergere nuove criticità, tuttora solo parzialmente risolte.

Infatti, la prevalenza di saggi molecolari *home-made*, per loro natura:

- non sottoposti a verifica di un organo terzo;
- con variabilità considerevole tra piattaforme, soprattutto in termini di performance;
- diverso livello di istruzione, addestramento ed esperienza del personale coinvolto nell'esecuzione di tali test;
- diffusione di schemi per la valutazione esterna della qualità forniti da organizzazioni prive del necessario accreditamento (ISO/IEC 17043:2010);

hanno fatto in modo che non si possa più prescindere da un controllo di qualità rispondente e dalla standardizzazione di metodi e tecnologie.

La valutazione di qualità esterna nazionale è un sistema di controllo il cui obiettivo principale è assicurare la coerenza delle analisi tra i diversi laboratori. Il controllo di qualità può identificare errori sistematici nelle procedure utilizzate dai laboratori che non possono essere rilevati da controlli di qualità interni. A questo proposito, AIOM e SIAPEC (Associazione Italiana di Oncologia Medica e Società Italiana di Anatomia Patologica e Citologia diagnostica) hanno formato un comitato scientifico permanente per la caratterizzazione molecolare dei tumori, con particolare riguardo all'identificazione di marcatori predittivi.

Nel primo controllo di qualità (2011) i casi da analizzare sono stati selezionati da tre centri di riferimento che ne hanno valutato lo stato mutazionale utilizzando differenti metodiche. Sono state selezionate 7 resezioni chirurgiche e 3 biopsie di campioni di carcinomi polmonari fissati in formalina ed inclusi in paraffina con almeno il 50% delle cellule tumorali.

Nel secondo controllo di qualità (2013) sono state selezionate 6 grosse biopsie e 4 piccole biopsie. Ad ogni campione è stato automaticamente assegnato un codice casuale, diverso per ogni centro, per non consentire l'identificazione dei campioni. Ai laboratori sono state date quattro settimane di tempo per completare le analisi e fornire i risultati di genotipizzazione. I centri sono stati inoltre invitati a fornire informazioni sulle metodiche utilizzate per l'analisi molecolare.

Un consiglio di assessori AIOM e SAIPEC ha valutato i risultati secondo un sistema di punteggio predefinito, in accordo con le linee guida europee di recente pubblicazione⁸⁶.

Il sistema di punteggio prevedeva l'assegnazione di due punti per il corretto genotipo e zero punti per i risultati falsi positivi o negativi. Un punto e mezzo è stato assegnato per i casi in cui il genotipo è stato registrato con un errore nella nomenclatura della mutazione. In caso di mancata estrazione/amplificazione non si può escludere che singoli campioni inviati ai centri potrebbero aver contenuto una quantità di materiale inferiore a quella programmata. Per questo motivo, è stato assegnato un punteggio solo parzialmente ridotto (1 punto) per il primo caso. Se un laboratorio non ha estratto DNA da più campioni, a quelli successivi non saranno invece attribuiti punti.

Prima di procedere all'esame dei risultati dei singoli centri, il Comitato Scientifico decide di porre come soglia per il superamento del Controllo di qualità un punteggio superiore a 18. Questa decisione viene presa partendo dalla considerazione che i risultati falsi positivi o negativi possono comunque indurre ad una scelta terapeutica non corretta e quindi ad un possibile danno per il paziente.

1.8.2. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

I campioni tumorali rappresentano una sfida unica per i saggi molecolari a causa della mescolanza variabile di cellule normali e neoplastiche. L'efficacia nel rilevare biomarcatori oncologici è una funzione diretta del rapporto di cellule neoplastiche e del limite di sensibilità della piattaforma impiegata per il saggio molecolare.

Vari approcci sono stati tentati nel tempo per stabilire l'efficacia nella rilevazione dei biomarcatori: dai campioni dei pazienti, alle linee cellulari stabili, agli oligonucleotidi sintetici mescolati con DNA genomico. Horizon Diagnostics ha creato i Molecular Reference Standards per valutare quantitativamente, nella routine del laboratorio, le performance dei saggi molecolari, superando le limitazioni proprie degli altri approcci utilizzati comunemente.

Horizon Diagnostics fornisce gli Standards in due formati: linee cellulari fissate in formalina e incluse in paraffina (FFPE) e DNA genomico (gDNA).

I kit Molecular Verification Panel permettono di monitorare la variabilità e verificare la sensibilità dei test molecolari per l'analisi mutazionale di EGFR. Gli Standard di riferimento contenuti nei kit sono generati mediante tecnologia *genome editing* di precisione basata sulla ricombinazione omologa, di proprietà della Horizon Diagnostics (GENESIS™). Ogni standard è caratterizzato da un

preciso genotipo e contiene un ben definito rapporto allelico. La copresenza di standard di riferimento in forma FFPE e gDNA consente di monitorare sia la fase preanalitica, sia il metodo di rilevamento della mutazione e valutarne le rispettive performance, in termini di sensibilità, specificità, accuratezza e precisione.

I Reference Standards Horizon Diagnostics fanno parte degli schemi per la valutazione esterna della qualità forniti dalle organizzazioni internazionali UK NEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Service) ed EMQN (European Molecular Genetics Quality Network).

2. SCOPO DELLA RICERCA

L'approccio diagnostico e la gestione dei pazienti con adenocarcinoma polmonare avanzato è cambiato significativamente con l'avvento di farmaci a bersaglio molecolare, quali gli inibitori dei recettori tirosin-chinasici.

La valutazione del profilo mutazionale del recettore tirosin-chinasico EGFR costituisce un'indagine fondamentale per selezionare i pazienti con NSCLC avanzato candidabili alla terapia con inibitori di recettori tirosin-chinasici.

Ad oggi esistono diverse tecnologie che consentono di eseguire l'indagine molecolare suddetta, quali Sequenziamento di Sanger, Pirosequenziamento e Real-Time PCR. Anche l'immunoistochimica è stata proposta, ancorchè non validata, come possibile indagine complementare a quelle di tipo molecolare.

Il primo scopo di questa tesi di Dottorato è stato quello di stabilire la sensibilità del Sequenziamento di Sanger e del Pirosequenziamento nell'identificare le mutazioni di EGFR utilizzando linee cellulari tumorali contenenti diluizioni scalari di alleli mutati di EGFR. Secondariamente, ci siamo proposti di validare l'accuratezza diagnostica di queste due tecnologie nell'ambito di controlli di qualità nazionali.

Lo scopo principale del presente lavoro è di condurre una analisi comparativa di Sequenziamento di Sanger, Pirosequenziamento ed immunoistochimica in una serie di pazienti con carcinoma polmonare primitivo non a piccole cellule. La valutazione dei risultati ha tenuto conto sia dell'accuratezza delle metodologie nell'identificazione delle mutazioni di EGFR che di altri fattori quali tempo di esecuzione, complessità della procedura e rapporto costi/benefici.

3. MATERIALI E METODI

3.1. CASISTICA

La casistica comprende 258 pazienti con NSCLC metastatico operati presso l'Istituto Clinico Humanitas di Rozzano. I criteri di inclusione: diagnosi istologica di NSCLC con tessuto tumorale disponibile; malattia metastatica trattata con Gefitinib o Erlotinib; presenza di almeno una lesione misurabile secondo i RECIST criteria.

3.2. ESTRAZIONE DI DNA DA TESSUTO FISSATO IN FORMALINA ED INCLUSO IN PARAFFINA.

Per ciascun paziente è stato selezionato il tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina contenente la maggior quantità di cellule tumorali. Il DNA è stato estratto secondo le istruzioni del Biostic FEPE tissue DNA Isolation Kit. Nei casi in cui la quantità di cellule tumorali sia risultata inferiore al 75% della popolazione cellulare sono state effettuate microdissezioni manuali del tessuto allo scopo di arricchire la cellularità neoplastica.

3.3. AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR

Nella prima parte dello studio il DNA è stato amplificato mediante PCR utilizzando primer specifici per gli esoni 18, 19, 20 e 21 di EGFR.

3.4. SEQUENZIAMENTO DI SANGER

I prodotti di PCR vengono purificati per eliminare dagli amplificati eventuali tracce della miscela di PCR mediante apposite colonnine (Millipore) e successivamente sottoposti a PCR di sequenza utilizzando una miscela di reazione preparata con il kit ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Successivamente i prodotti di PCR di sequenza vengono ulteriormente purificati utilizzando il DyeEx 2.0 Spin kit (Quiagen). Il DNA purificato viene caricato su sequenziatore ABI 3100 (Applied Biosystems) che utilizza la metodica di Sanger. La sequenza ottenuta viene confrontata con quella originale depositata in banca dati

(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) per ricercare il codone contenente l'alterazione genetica ed eventualmente la corrispondente sostituzione aminoacidica.

3.5. PIROSEQUENZIAMENTO

Previa amplificazione del DNA estratto da tessuto tumorale su "Rotor-Gene Q" (Qiagen), la genotipizzazione e la quantificazione allelica delle singole mutazioni avvengono tramite Pirosequenziamento attraverso lo strumento "PyroMark Q96 ID" (Qiagen) impostando specifiche entry per ogni test di EGFR.

3.6. ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA

Nell'ultima parte dello studio abbiamo preso in considerazione 73 casi (14 casi appartenenti alla casistica interna e 59 appartenenti ad una casistica esterna) di adenocarcinomi con mutazione per EGFR dimostrata con Pirosequenziamento. Questa casistica è stata studiata con metodica immunohistochemica utilizzando anticorpi specifici. Le colorazioni sono state eseguite con Immunocoloratore (Dako) e per ognuna di esse è stato inserito un idoneo controllo positivo ed un cut-off di immunoreattività, per confermare l'avvenuta reazione.

4. RISULTATI

4.1. SAGGIO DI SENSIBILITA' DEL TEST MOLECOLARE MEDIANTE SEQUENZIAMENTO DI SANGER E PIROSEQUENZIAMENTO

Nel nostro laboratorio di diagnostica molecolare abbiamo condotto un saggio di sensibilità (vedi Materiali e Metodi), allo scopo di determinare la quantità minima di alleli mutati rilevabili dal sequenziamento di Sanger e dal pirosequenziamento.

È stato utilizzato DNA genomico di una linea cellulare con mutazione di EGFR (E746-A750del) diluito con DNA genomico di una linea cellulare *wild-type*, fornendo così degli standard a diversa frequenza dell'allele mutato, come riportato in tabella 3.

Tabella 3. Standard quantitativi di linee cellulari wt e mutate per l'esone 19 di EGFR.

Standard quantitativi	Frequenza alleli mutati	Frequenza alleli wt
HD 364 (gDNA)	0	100%
HD 363 (gDNA)	50%	50%
HD 382 (gDNA)	20%	80%
HD 400 (gDNA)	10%	90%
HD 433 (gDNA)	1%	99%
HD 141 (FFPE)	0	100%
HD 308 (FFPE)	50%	50%

gDNA: DNA genomico; FFPE: linee cellulari fissate in formalina e incluse in paraffina.

Con il sequenziamento di Sanger il segnale di mutazione è stato osservato negli standard HD 363, HD 308 (Figura 14) e HD 382 (Figura 15). Con il pirosequenziamento il segnale di mutazione è stato osservato negli standard HD 363, HD 308 (Figura 19) HD 382 (Figura 20) e HD 400 (Figura 21) come atteso. In entrambi i metodi non è stato rilevato alcun segnale di mutazione negli standard HD 433 (Figura 17 e 22), HD 364 e HD 141 (Figura 13 e 18).

Per il sequenziamento di Sanger abbiamo quindi stabilito una soglia minima di sensibilità del 20%; per il pirosequenziamento una soglia di sensibilità del 10%.

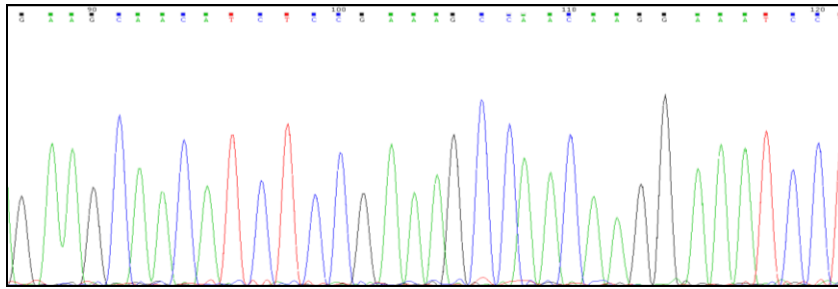


Figura 13. Sequenze HD 364 e HD 141. Il cromatogramma non evidenzia picchi mutazionali e conferma l'assenza di mutazione dell'esone 19.

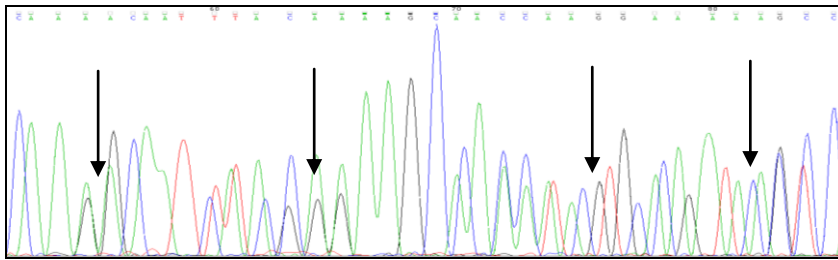


Figura 14. Sequenze HD 363 e 308. Il cromatogramma mostra alterazione dei picchi (frecce) che confermano la presenza della delezione E746-A750 nel 50% degli alleli mutati.

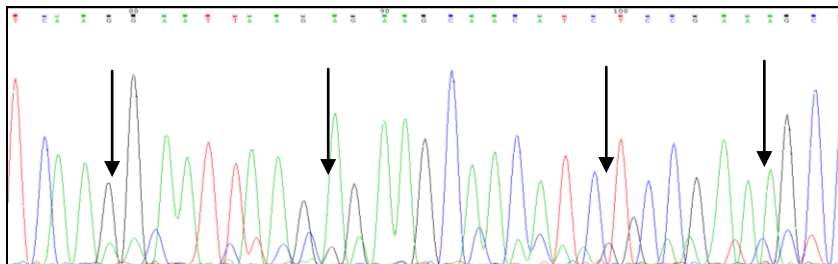


Figura 15. Sequenza HD 382. Il cromatogramma mostra alterazione dei picchi (frecce) che confermano la presenza della delezione E746-A750 nel 20% degli alleli mutati.

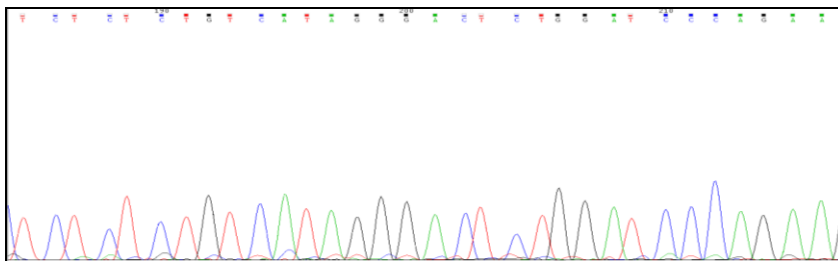


Figura 16. Sequenza HD 400. Il cromatogramma non mostra alterazione dei picchi e quindi non rileva la presenza della delezione presente nel 10% degli alleli mutati.

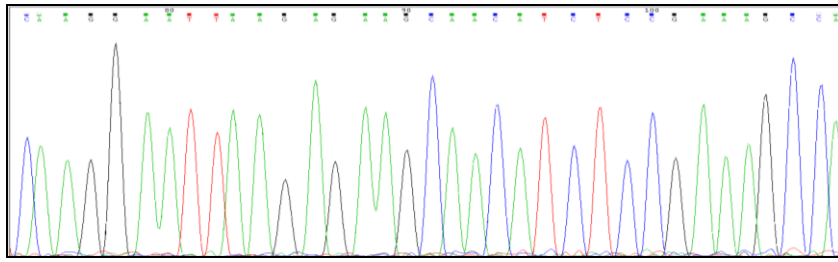


Figura 17. Sequenza HD 433. Il cromatogramma non mostra alterazione dei picchi e quindi non rileva la presenza della delezione presente nel 1% degli alleli mutati.

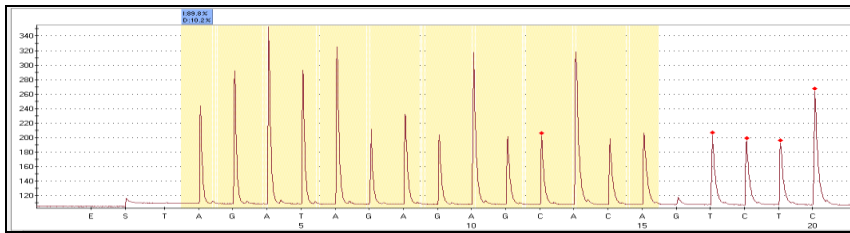


Figura 18. Sequenze HD 364 e HD 141. Il pirogramma non evidenzia picchi mutazionali e conferma l'assenza di mutazione dell'esone 19.

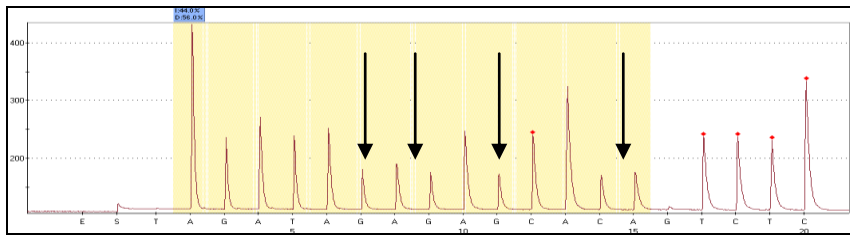


Figura 19. Sequenze HD 363 e HD 308. Il pirogramma evidenzia una tipica alterazione nei picchi (frecce) che confermano la presenza della delezione E746-A750 nel 50% degli alleli mutati.

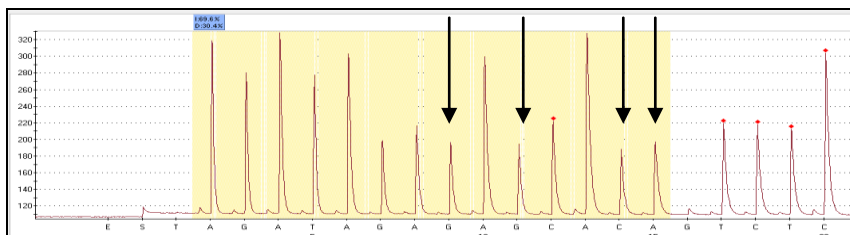


Figura 20. Sequenza HD 382. Il pirogramma evidenzia una tipica alterazione nei picchi (frecce) che confermano la presenza della delezione E746-A750 nel 20% degli alleli mutati.

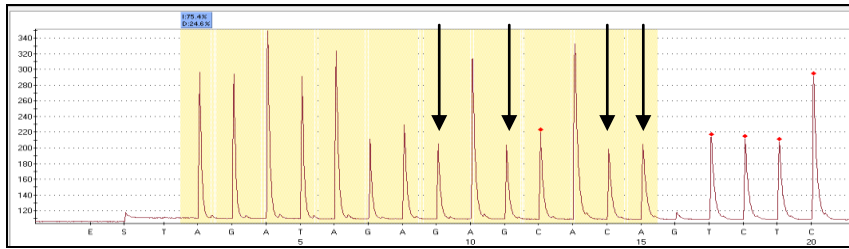


Figura 21. Sequenza HD 400. Il pirogramma evidenzia alterazioni nei picchi (freccie) che confermano la presenza della delezione E746-A750 nel 10% degli alleli mutati.

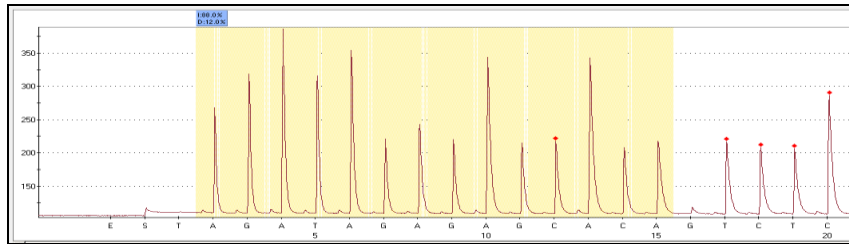


Figura 22. Sequenza HD 433. Il pirogramma non evidenzia alterazioni nei picchi e quindi non rileva la presenza della delezione presente nel 1% degli alleli mutati.

4.2. TEST DI DETERMINAZIONE DELL'ASSETTO MUTAZIONALE DI EGFR: ACCURATEZZA DIAGNOSTICA.

Allo scopo di validare l'accuratezza diagnostica delle nostre due tecnologie, abbiamo effettuato il test mutazionale su sezioni esterne fornite dal Gruppo di Lavoro AIOM-SIAPEC per la caratterizzazione bio-molecolare dei tumori polmonari e dello stato mutazionale di EGFR. Nel primo saggio (2011) sono state analizzate 7 resezioni chirurgiche e 3 biopsie di campioni di carcinomi polmonari fissati in formalina ed inclusi in paraffina con almeno il 50% delle cellule tumorali. L'autorità esterna ha spedito materiale depositato su 1 vetrino per ogni caso. Abbiamo identificato la presenza di 7 campioni wt; 2 campioni mutati nell'esone 19 (E746-A750del) e 1 campione mutato nell'esone 21 (L858R).

Nel secondo saggio (2013) sono state analizzate 6 grosse biopsie e 4 piccole biopsie di campioni di carcinomi polmonari fissati in formalina ed inclusi in paraffina con almeno il 50% delle cellule tumorali. L'autorità esterna ha spedito materiale depositato in 1 Eppendorf (con 2 sezioni da 10um) per ogni caso. Abbiamo identificato la presenza di 5 campioni wt; 4 campioni mutati nell'esone 19 (2 E746-A750del, 1 del E746-S752 Ins V, 1 del L747-P753 Ins S) e 1 campione mutato nell'esone 21 (L858R). L'autorità esterna ha confermato essere questo il profilo mutazionale atteso.

4.3. SEQUENZIAMENTO DI SANGER

E' stato analizzato il profilo mutazionale degli esoni 18, 19, 20 e 21 di EGFR, mediante sequenziamento di Sanger, in 258 NSCLC (229 adenocarcinomi e 29 carcinomi squamocellulari).

I casi con carcinoma squamocellulare non hanno evidenziato mutazioni a carico di EGFR, mentre in 26 casi con adenocarcinoma è stato possibile evidenziare almeno un evento mutazionale (26/229, 11.4%) (Tabella4). In un caso è stata evidenziata la contemporanea presenza di due mutazioni (R766H + L858R).

Tabella 4. Analisi mutazionale mediante Sequenziamento di Sanger

Istologia	CASI (n=258)	
	EGFR WT	EGFR NON WT
Adenocarcinomi (n=229)	203 (88,6%)	26 (11,4%)*
Carcinomi Squamocellulari (n=29)	29 (100%)	0

*in un caso sono state riscontrate contemporaneamente due mutazioni a carico di EGFR.

Come riportato in tabella 5, le mutazioni riscontrate erano principalmente a carico degli esoni 19, 20 e 21; nell'esone 19 sono state evidenziate delezioni in-frame nella maggior parte dei casi, mentre negli esoni 20 e 21 sostituzioni puntiformi (Figure 23, 24 e 25).

Tabella 5. Mutazioni di EGFR identificate mediante sequenziamento di Sanger (26 casi).

	TIPOLOGIA DELLE MUTAZIONI	EVENTI MUTAZIONALI n=27 (%)
ESONE 19	<i>E746-A750del</i>	13 (48,2)
	<i>E746-T751del</i>	1 (3,7)
	<i>L747-S752del</i>	1 (3,7)
	<i>L747-P753del</i>	1 (3,7)
ESONE 20	<i>R766H</i>	2 (7,4)
ESONE 21	<i>L858R</i>	8 (29,6)
ESONE 20 E 21	<i>R766H + L858R</i>	1 (3,7)

4.4. PIROSEQUENZIAMENTO

Successivamente abbiamo esaminato con pirosequenziamento soltanto la serie di adenocarcinomi. I dati indicano presenza di mutazione di EGFR in 30 casi (13,1%). In un caso è stata evidenziata la contemporanea presenza di due mutazioni (R766H + L858R). Come riportato in tabella 7, le mutazioni sono state riscontrate principalmente negli esoni 19, 20 e 21; nell'esone 19 sono state evidenziate delezioni in-frame nella maggior parte dei casi, mentre negli esoni 20 e 21 sostituzioni puntiformi (Figure 26, 27 e 28).

Tabella 7. Mutazioni negli esoni 19, 20 e 21 di EGFR identificate mediante Pirosequenziamento (30 casi).

	TIPOLOGIA DELLE MUTAZIONI	EVENTI MUTAZIONALI n=31 (%)
ESONE 19	<i>E746-A750del</i>	15 (48,4)
	<i>E746-T751del</i>	1 (3,2)
	<i>L747-S752del</i>	1 (3,2)
	<i>L747-P753del</i>	1 (3,2)
ESONE 20	<i>R766H</i>	2 (6,5)
ESONE 21	<i>L858R</i>	9 (29,1)
	<i>L861Q</i>	1 (3,2)
ESONE 20 E 21	<i>R766H + L858R</i>	1 (3,2)

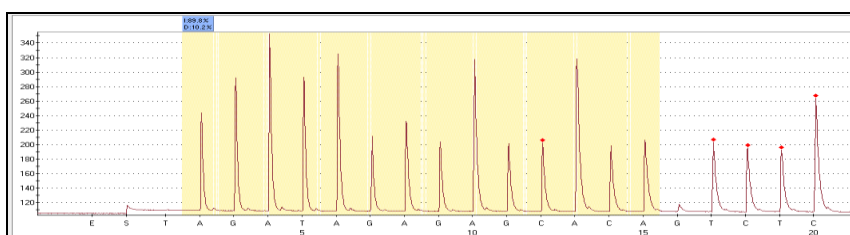


Figura 26. Esempio di pirogramma di un campione wt per l'esone 19 di EGFR. si noti l'assenza di alterazione dei picchi nella sequenza.

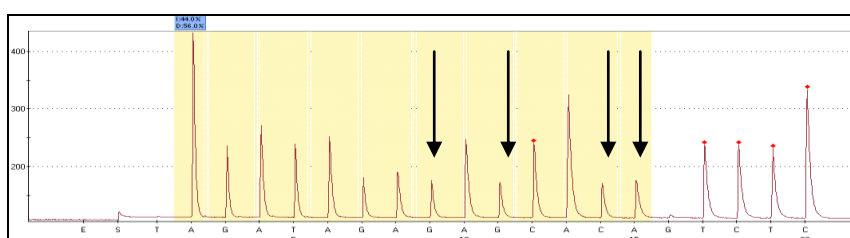


Figura 27. Esempio di pirogramma di un campione mutato per l'esone 19 di EGFR (E746-A750del). Si noti la tipica alterazione dei picchi nella sequenza (frecce).

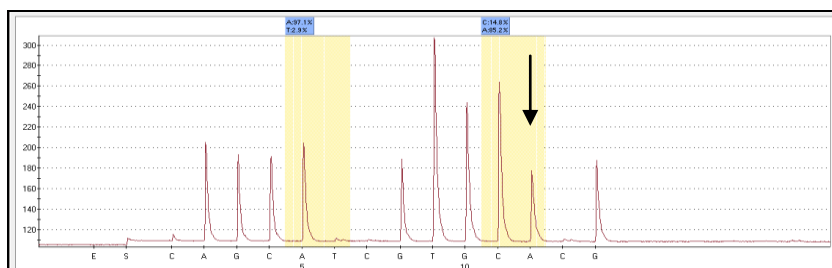


Figura 28. Esempio di pirogramma di un campione mutato per l'esone 21 di EGFR (L858R). Si noti la tipica alterazione dei picchi nella sequenza (freccia).

La tabella 8 riporta la tipologia del materiale in cui sono state evidenziate le mutazioni.

Tabella 8. Analisi Mutazionale di 229 Adenocarcinomi mediante Pirosequenziamento

CASI	Chirurgici (n=108)	Biopsie (n=121)	Totale (n=229)
Con EGFR WT	89 (82,4%)	110 (90,9%)	199 (86,9%)
Con EGFR MUTATO	19 (17,6%)*	11 (9,1%)	30 (13,1%)

*in un caso sono state riscontrate contemporaneamente due mutazioni a carico di EGFR.

Non sono state osservate correlazioni statisticamente significative tra la presenza delle mutazioni e le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti.

4.5. CONFRONTO TRA SEQUENZIAMENTO DI SANGER E PIROSEQUENZIAMENTO

La tabella 8 riporta il confronto dell'analisi mutazionale di EGFR eseguita con il sequenziamento di Sanger e l'analisi mediante pirosequenziamento. Come riportato dalla tabella 9 è stato possibile evidenziare un maggior numero di casi mutati utilizzando la seconda tecnologia.

Tabella 9. Confronto tra sequenziamento di Sanger e pirosequenziamento

	Adenocarcinomi (n=229)	
	EGFR WT	EGFR NON WT
SANGER	203 (88,6%)	26 (11,4%)
PIROSEQUENZIAMENTO	199 (86,9%)	30 (13,1%)

Nello specifico i casi identificati come mutati al pirosequenziamento e non dal sequenziamento di Sanger erano rappresentati da 2 campioni biotipici e 2 campioni chirurgici contenenti una ridotta percentuale di cellule tumorali (circa 20%).

Le mutazioni evidenziate unicamente col pirosequenziamento comprendono:

- 2 mutazioni dell'esone 19 [E746-A750del] (Figura 29 A e B);
- 1 mutazione dell'esone 21 [L858R] (Figura 29 1C e 2C);
- 1 mutazione dell'esone 21 [L861Q] (Figura 29 1D e 2D);

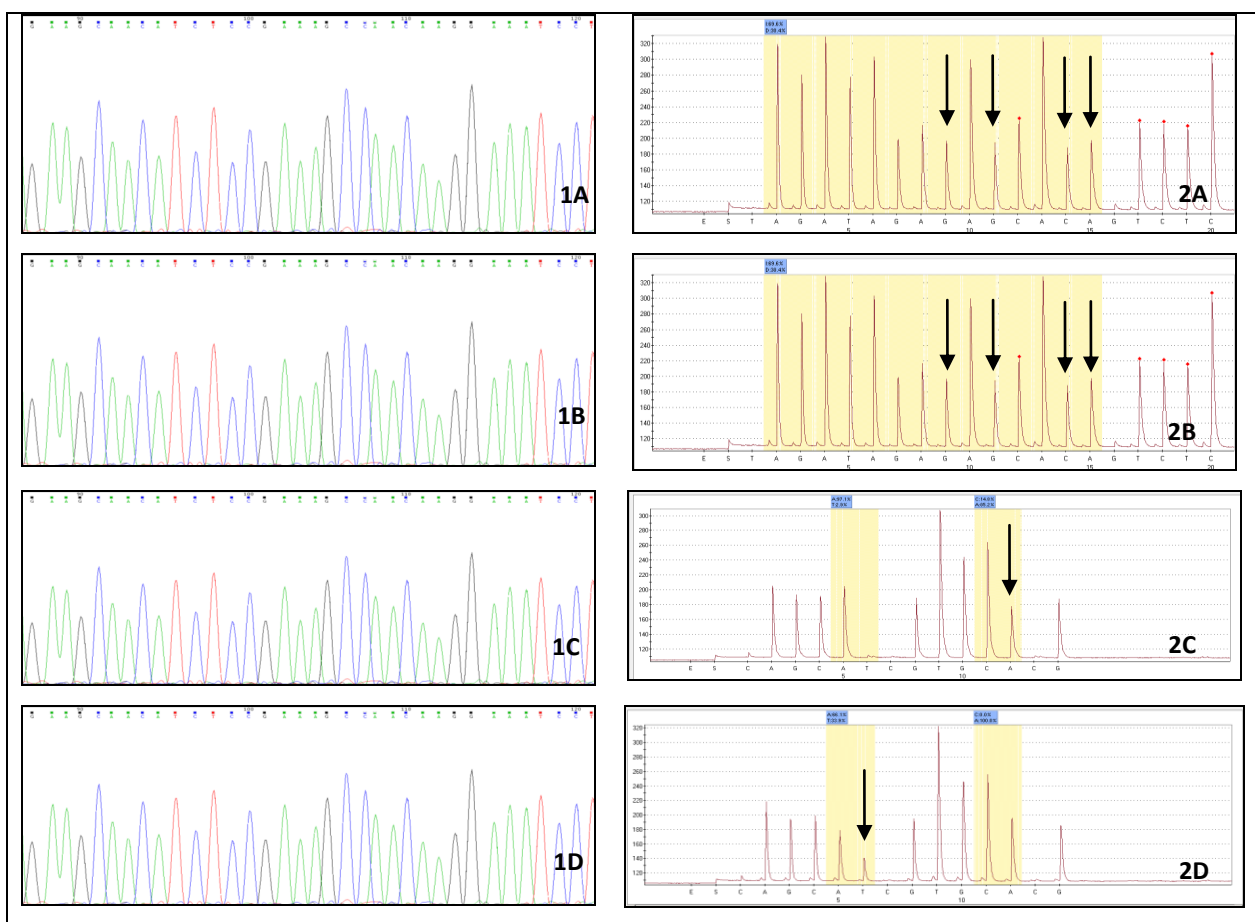


Figura 29. A1 e A2, B1 e B2. Cromatogrammi e pirogrammi relativi ai 2 campioni risultati wt per l'esone 19 al sequenziamento di Sanger ma mutati al pirosequenziamento (E746-A750del) (freccie); C1 e C2. Cromatogramma e pirogramma relativo al campione risultato wt per l'esone 21 al sequenziamento di Sanger ma mutato al pirosequenziamento (L858R) (freccia). D1 e D2. Cromatogramma e pirogramma relativo ai campione risultato wt per l'esone 21 al sequenziamento di Sanger ma mutato al pirosequenziamento (L861Q) (freccia).

4.6. IMMUNOISTOCHEMICA

Abbiamo inoltre valutato l'accuratezza diagnostica dell'immunoistochimica nell'identificazione delle mutazioni E746-A750del dell'esone 19 e L858R dell'esone 21 mediante l'utilizzo di anticorpi specifici. A tal fine è stata analizzata una ulteriore casistica di 169 adenocarcinomi a profilo mutazionale noto al pirosequenziamento [41 casi mutati per l'esone 19 di EGFR (E746-A750del); 31 mutati per l'esone 21 (L858R); 20 wt per l'esone 19 e 77 wt per l'esone 21].

I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 10 ed illustrati nella Figura 30 come segue:

- 1- Anticorpo anti EGFR esone 19 (E746-A750 deletion specific (6B6) antibody): di 41 casi mutati al Pirosequenziamento, 29 hanno mostrato immunoreattività citoplasmatica e di membrana (Sensibilità: 70,7%), mentre nessun caso wt al pirosequenziamento ha mostrato immunoreattività (Specificità: 100%); l'accuratezza diagnostica è risultata quindi pari all'80,3%.
- 2- Anticorpo anti EGFR esone 21 (L858R mutant-specific (43B2) antibody): di 31 casi mutati al pirosequenziamento, 21 hanno mostrato immunoreattività citoplasmatica e di membrana (Sensibilità: 67,7%), mentre nessun caso wt al Pirosequenziamento ha mostrato immunoreattività (Specificità: 100%); l'accuratezza diagnostica è risultata quindi pari all'90,7%.

Tabella 10. Risultati ottenuti dall'indagine immunoistochimica.

Immunoistochimica			
Anti- EGFR esone 19 [E746-A750 deletion specific (6B6)] (n=61)		EGFR WT n=41	EGFR NON WT n=20
	IR +	29 (70,7%)	0
	IR -	12 (29,3%)	20 (100%)
Anti EGFR esone 21 [L858R mutant-specific (43B2)] (n=108)		EGFR WT n= 31	EGFR NON WT n=77
	IR +	21 (67,7%)	0
	IR -	10 (32,3%)	77 (100%)

IR+: presenza di immunoreattività; IR-: assenza di immunoreattività

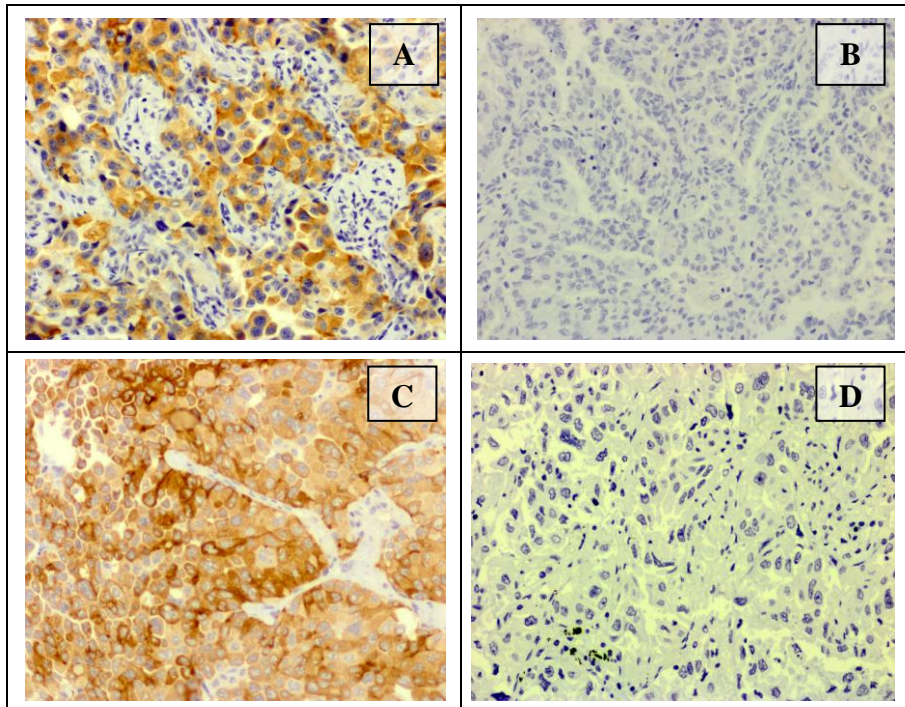


Figura 30. A e B. Colorazione immunohistochimica eseguita con l'anticorpo Anti- EGFR esone 19 [E746-A750 deletion specific (6B6)]. A. caso mutato al pirosequenziamento; B. caso wt al pirosequenziamento; C e D. colorazione immunohistochimica eseguita con l'anticorpo Anti EGFR esone 21 [L858R mutant-specific (43B2)]. C. caso mutato al pirosequenziamento; D. caso wt al pirosequenziamento.

5. DISCUSSIONE

EGFR è un recettore transmembrana ad attività tirosin-chinasica attivabile da diversi ligandi. Questo evento innesca una cascata di segnali a valle con effetti sulla sopravvivenza e la proliferazione cellulare. L'evento mutazionale di EGFR è in grado di indurre l'attivazione costituzionale che può essere efficacemente bloccata dalla somministrazione di farmaci ad azione anti-recettoriale. La valutazione del profilo mutazionale di EGFR costituisce un'indagine fondamentale per selezionare i pazienti con NSCLC avanzato candidabili alla terapia con farmaci inibitori di recettori tirosin-chinasici. È quindi di estrema importanza disporre di tecniche accurate per l'analisi mutazionale di EGFR. Ad oggi sono utilizzate diverse tecnologie per eseguire l'indagine molecolare suddetta, quali sequenziamento di Sanger, Pirosequenziamento, e Real Time PCR. Anche l'immunoistochimica è stata proposta, ancorchè non validata, come possibile indagine complementare a quelle di tipo molecolare.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di condurre una analisi comparativa di alcune di queste tecnologie segnatamente sequenziamento di Sanger, pirosequenziamento ed immunoistochimica, in una serie di pazienti con carcinoma polmonare primitivo non a piccole cellule avanzato. La valutazione dei risultati ha tenuto conto sia dell'accuratezza delle metodologie che di altri fattori quali tempo di esecuzione, complessità della procedura e rapporto costi/benefici.

In una prima fase ci siamo occupati della determinazione della sensibilità del Sequenziamento di Sanger e del Pirosequenziamento nell'identificare le mutazioni di EGFR utilizzando linee cellulari contenenti diluizioni scalari (1, 10, 20, 50%) di alleli mutati nell'esone 19 (E746-A750del). In accordo con quanto suggerito dalla letteratura, la sensibilità del sequenziamento di Sanger nelle nostre mani è risultata del 20%, a fronte di una sensibilità del 10% del pirosequenziamento^{86 87 88}, che quindi si conferma la tecnica molecolare più idonea alla determinazione dell'assetto mutazionale del gene. Una possibile interpretazione di questo dato può risiedere nel fatto che con il pirosequenziamento si analizza una sequenza relativamente corta e definita nell'ambito di hot-spot mutazionali mentre il sequenziamento di Sanger analizza segmenti che includono l'intero esone.

Abbiamo successivamente inteso verificare l'accuratezza procedurale e diagnostica delle metodologie da noi sottoposte a confronto, nell'ambito di controlli di qualità esterni al nostro laboratorio. Riteniamo infatti che il buon funzionamento e la qualità di una tecnica molecolare non

si possano misurare soltanto utilizzando dei controlli positivi e negativi noti durante la corsa né accontentandosi di ottenere risultati di frequenza mutazionale allineati a quelli della letteratura. Piuttosto crediamo indispensabile far valutare e validare la qualità dei nostri test molecolari da una autorità esterna al nostro laboratorio. Attualmente in Italia l'unica autorità di questo tipo è rappresentata dal gruppo di lavoro AIOM-SIAPEC. Le analisi effettuate nel nostro laboratorio per conto di questa autorità esterna hanno dimostrato l'assoluta idoneità delle nostre tecnologie per lo studio mutazionale oggetto del presente lavoro. È interessante rilevare che dai dati emersi dal controllo di qualità molecolare gestito dall'autorità AIOM-SIAPEC le prime due tecnologie impiegate nei laboratori italiani nello studio mutazionale sono risultate essere nell'ordine il sequenziamento di Sanger ed il pirosequenziamento. In particolare, dal confronto tra i dati riportati, il numero di laboratori che adottano il pirosequenziamento è in crescita rispetto al sequenziamento di Sanger. Questo dato è in linea con la maggiore sensibilità e rapidità esecutiva del pirosequenziamento rispetto alla metodica del sequenziamento di Sanger. Effettivamente, per quanto attiene l'analisi comparata da noi effettuata tra sequenziamento di Sanger e pirosequenziamento abbiamo sostanzialmente confermato la maggiore idoneità della seconda tecnologia rispetto alla prima nella capacità di identificare mutazioni di EGFR. Trattandosi di eventi relativamente infrequenti abbiamo voluto analizzare una serie importante di adenocarcinomi polmonari, oltre 200 casi. Nonostante la numerosità complessiva della serie, la totalità delle mutazioni di EGFR è stata di 30 casi documentati al pirosequenziamento e 26 con il sequenziamento di Sanger. Ancorchè 4 casi aggiuntivi possano sembrare relativamente pochi tuttavia si tratta di un guadagno di circa il 15% sulla totalità degli eventi mutazionali. L'analisi al pirosequenziamento è in grado di recuperare nella pratica clinica una maggiore percentuale di pazienti con carcinoma polmonare avanzato da candidarsi a terapia farmacologica. La ragione di ciò sta nella maggiore sensibilità della tecnica del pirosequenziamento, come già discusso, che ne consente una affidabile applicazione anche in caso di materiale biotico ottenuto non solo a scopo diagnostico ma soprattutto per la caratterizzazione molecolare del tumore. Certamente altre tecniche quali la Real-Time PCR rappresentano valide alternative al pirosequenziamento in quanto ritenute ancora più sensibili (1-5% degli alleli mutati) ma che sono tuttavia più costose e limitate nell'ambito dello spettro di mutazioni da essa rilevate.

Una tecnica che consente in casi individuali di identificare mutazioni in singoli alleli (singole cellule) è l'immunoistochimica per la quale sono ad oggi infatti disponibili due anticorpi specifici per le due forme mutate di EGFR più frequenti (anticorpo anti-E746-A750del e anticorpo anti-L858R). Tale

tecnica tuttavia se cimentata su una parte della casistica da noi analizzata nel confronto con altre tecniche molecolari ha documentato una ridotta sensibilità pari al 67-69% pur mantenendo una specificità assoluta. In altri termini, nel singolo caso immunoreattivo, è possibile documentare anche la presenza di un singolo allele mutato, con ciò risultando l'immunoistochimica, nel singolo caso individuale, superiore alle altre tecniche molecolari utilizzate (sensibilità 10-20%). Tuttavia, in serie orizzontale di casi quali quelli analizzati nella pratica clinica esiste una quota di casi con mutazione di EGFR che risultano non immunoreattivi utilizzando anticorpi specifici. Una possibile spiegazione di ciò potrebbe essere legata ad un difetto di penetrazione dell'anticorpo a sua volta funzionale alla difficoltà della standardizzazione nella fase preanalitica dell'immunoistochimica del processamento dei campioni (tempo intercorso tra il prelievo e la fissazione, dimensioni campioni, durata fissazione, tipologia della fissazione, spessore dei tessuti, predigestione dei tessuti, temperatura, ecc.). È di tutta evidenza come la variabilità di questa fase preanalitica limiti maggiormente l'accessibilità di un anticorpo al suo bersaglio proteico rispetto alla capacità di amplificare piccoli frammenti di DNA estratto dagli stessi tessuti. Abbiamo dunque potuto documentare che la tecnica immunoistochimica è sufficientemente accurata, soprattutto per l'analisi di campioni a bassa cellularità tumorale. Essa ha il vantaggio di fornire informazioni riguardo la localizzazione e la quantificazione della popolazione tumorale che è sede degli eventi mutazionali, consentendo di determinare l'eventuale eterogeneità della popolazione rispetto allo stato mutazionale di EGFR.

La tabella 10 riporta un confronto tra le tre tecnologie (Sequenziamento di Sanger, Pirosequenziamento ed Immunoistochimica) in termini di sensibilità nell'identificazione degli alleli mutati, tempistica di esecuzione e analisi dei costi vivi. Non abbiamo voluto introdurre i costi del personale che sono legati alla lunghezza procedurale delle indagini.

Tabella 11. Confronto tra Sequenziamento di Sanger, Pirosequenziamento e Immunoistochimica

	Sensibilità (% alleli tumorali)	Tempistica	Costi	Marcatura CE-IVD
Sequenziamento di Sanger	20%	5 giorni	90€/pz	No
Pirosequenziamento	10%	3 giorni	120€/pz	Sì
Immunoistochimica	Sino a singola cellula	1 giorno	15€/pz	No

È di tutta evidenza come in teoria la miglior tecnica con il miglior rapporto costi-benefici sarebbe rappresentata dall'immunoistochimica, mentre le tecniche molecolari sono caratterizzate da

tempi di esecuzione e costi nettamente superiori. Tuttavia per le motivazioni di cui sopra, e nonché per la capacità di rilevare un ridotto spettro di eventi mutazionali, nella vita reale dell'attuale pratica clinica per i limiti intrinseci dell'immunoistochimica, questa può essere proposta solo in una fase di screening dell'assetto mutazionale.

Come suggerito dalle recenti linee guida pubblicate dal *College of American Pathologists*⁸⁶, gli anticorpi specifici per le due forme mutate potrebbero essere utilizzati come screening iniziale per identificare nel minor tempo possibile la maggior parte dei pazienti candidabili a terapia mediante inibitori di EGFR, garantendo una specificità assoluta ed una discreta sensibilità. Qualora l'indagine risultasse positiva infatti saremmo in grado di riportare lo stato mutazionale di EGFR velocemente e con bassi costi. Tuttavia, per tutti i campioni negativi ai 2 anticorpi monoclonali specifici, il test molecolare risulta ad oggi ancora necessario. Inoltre per proporre l'indagine immunoistochimica quale tecnica di screening delle mutazioni più frequenti sono necessari studi prospettici di validazione clinica.

Il pirosequenziamento si è dimostrato nelle nostre mani la metodica molecolare più sensibile, in grado di rilevare il maggior numero di mutazioni anche in presenza di materiale neoplastico molto scarso. Di converso il Pirosequenziamento è limitato nella sua capacità di definire la tipologia mutazionale nel caso di delezione/inserzione. Pertanto nel caso si desideri conoscere la sequenza della delezione/inserzione, è necessario ripetere l'analisi utilizzando il sequenziamento di Sanger.

In conclusione, è possibile ipotizzare l'utilizzo del seguente algoritmo in ordine alla valutazione dello stato mutazionale di EGFR, nella pratica clinica (Figura 31).

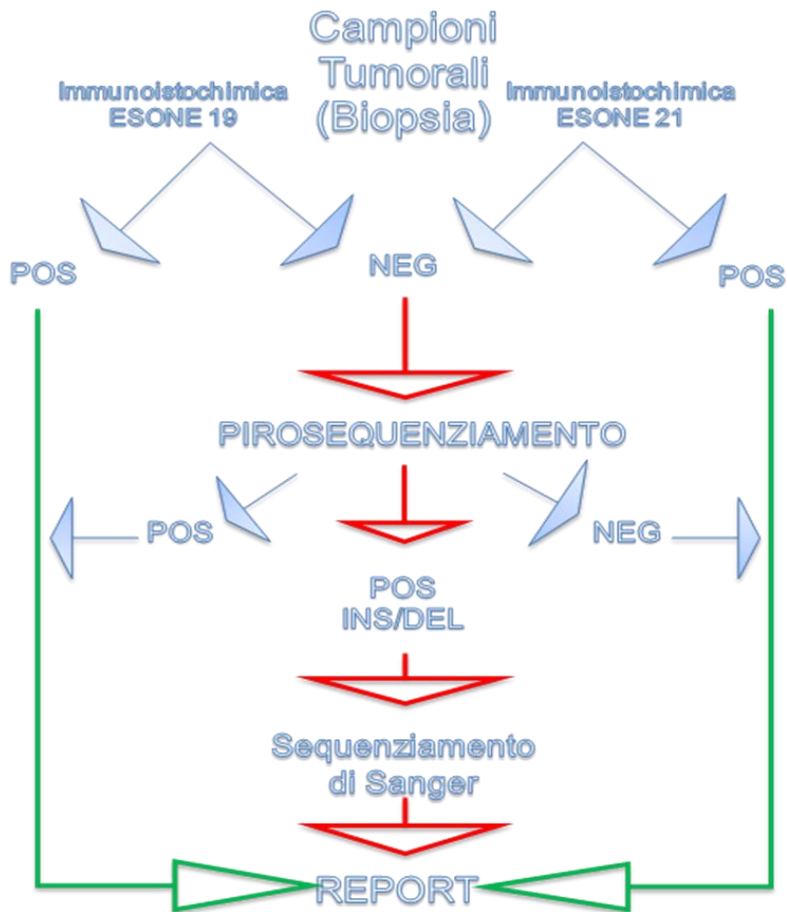


Figura 31. Algoritmo utilizzabile nella pratica clinica per la scelta delle tecnologie da utilizzare per la valutazione dello stato mutazionale di EGFR

L'indagine immunoistochimica potrebbe essere utilizzata come metodica iniziale di screening su campioni di NSCLC garantendo una specificità assoluta ed una discreta sensibilità. Per i pazienti con materiale a bassa cellularità neoplastica, per i quali l'indagine molecolare potrebbe esitare in un risultato falso negativo, l'immunoistochimica potrebbe essere la migliore opzione disponibile per la sua capacità di identificare le mutazioni più frequenti di EGFR in singola cellula. Infatti, qualora l'indagine risultasse positiva saremmo in grado di riportare lo stato mutazionale di EGFR in maniera corretta con bassi costi ed impiegando una giornata lavorativa (Figura 14 *Linea Verde*). Qualora l'indagine immunoistochimica risultasse negativa, il nostro studio suggerisce di procedere con l'analisi mutazionale mediante Pirosequenziamento che, pur avendo tempi di esecuzione più lunghi dell'immunoistochimica, risulta la tecnica maggiormente standardizzata. In caso di delezione/inserzione si potrebbe procedere ad ulteriore valutazione tramite sequenziamento di Sanger (Figura 14 *Linea Rossa*).

6. APPENDICI

6.1. CASISTICA

Le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti sono riportate in tabella 12.

Tabella 12. Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti con NSCLC.

	chirurgici (n =127)	biopsie (n =131)	totale (n =258)
SESSO			
MASCHI	87 (68,5%)	85 (64,9%)	172 (66,7%)
FEMMINE	40 (31,5%)	46 (35,1%)	86 (33,3%)
ABITUDINE AL FUMO			
NO	15 (11,8%)	20 (15,3%)	35 (13,6%)
SI	101 (79,5%)	97 (74,0%)	198 (76,7%)
NON NOTA	11 (8,7%)	14 (10,7%)	25 (9,7%)
ISTOLOGIA			
ADENOCARCINOMA	108 (85,0%)	65 (49,6%)	173 (67,1%)
CARCINOMA SQUAMOCELLULARE	19 (15,0%)	10 (7,6%)	29 (11,2%)
NAS	0 (%)	56 (42,8%)	56 (21,7%)
STADIO			
T1	23 (18,1%)	4 (3,1%)	27 (10,5%)
T2	57 (44,9%)	7 (5,3%)	64 (24,8%)
T3	24 (18,9%)	28 (21,4%)	52 (20,1%)
T4	20 (15,7%)	70 (53,4%)	90 (34,9%)
ND	3 (2,4%)	22 (16,8%)	25 (9,7%)

ND: Non determinato

NAS: Non Altrimenti Specificato

- Centrifugare a 12000 rpm per 10 min a temperatura ambiente
- Recuperare il sovrantante
- Aggiungere 1/10 del volume di Na-acetato 3M pH 5.5 e da 1 a 3 volumi di etanolo freddo 100%
- Incubare a -20°C per almeno 1h
- Centrifugare a 12000 rpm per 30 min a 4°C
- Eliminare il sovrantante
- Aggiungere 200 μl di etanolo freddo 70%
- Centrifugare a 12000 rpm per 5 min a temperatura ambiente
- Eliminare il sovrantante
- Lasciare asciugare il pellet e, risospendere il DNA in 50 μl di acqua deionizzata.

6.3. QUANTIFICAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI DNA MEDIANTE SPETTROFOTOMETRO

Prima di utilizzare il DNA negli esperimenti di biologia molecolare o a scopo diagnostico è necessario valutare la concentrazione del DNA nella soluzione con cui lavoriamo. La determinazione spettrofotometrica della concentrazione del DNA è il metodo principale, molto accurato. La spettrofotometria (o spettrometria) UV-visibile si basa sull'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche monocromatiche del campo del visibile e dell'UV da parte di molecole.

La figura 32 mostra lo schema a blocchi di uno spettrofotometro in cui:

S è la sorgente luminosa, che può essere una lampada a incandescenza per le analisi nel campo del visibile o una lampada al deuterio per le analisi nel campo dell'UV;

M è il monocromatore che seleziona e lascia passare la lunghezza d'onda impostata dall'operatore e disperde le altre;

C è la cuvetta che contiene la soluzione da analizzare;

R è il rivelatore che trasforma l'intensità della radiazione elettromagnetica giunta ad esso in un segnale elettrico;

A è l'amplificatore che amplifica il segnale elettrico del rivelatore;

I è il registratore che fornisce il valore di assorbanza.

La parte più importante dello spettrofotometro è sicuramente la cuvetta (Figura 33) contenente la soluzione con la sostanza da analizzare.

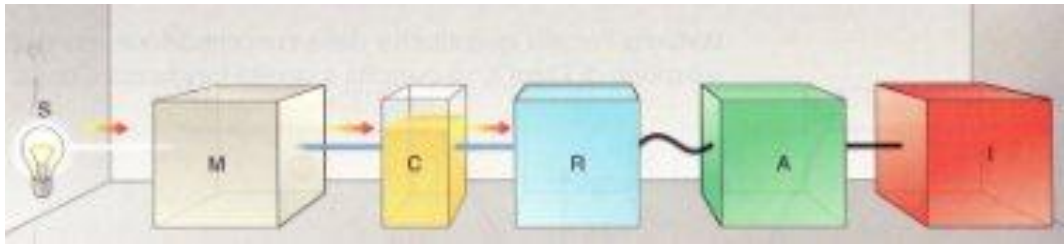


Figura 32. Schema a blocchi di uno spettrofotometro

Supponiamo che sia I_0 l'intensità della luce monocromatica incidente. La soluzione assorbe in parte l'intensità della radiazione incidente e all'uscita della cuvetta l'intensità sarà stata ridotta ad un valore che chiamiamo I :

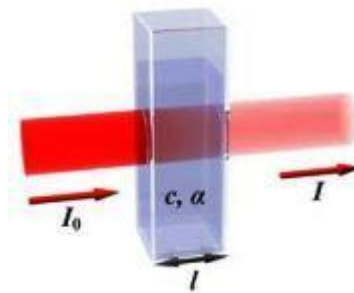


Figura 33. cuvetta

L'assorbimento di luce da parte della soluzione viene definito da una grandezza che prende il nome di assorbanza (A) che viene calcolata con la seguente formula:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T}$$

in cui T è la trasmittanza, un'altra grandezza fondamentale utile per esprimere l'assorbimento di radiazioni elettromagnetiche.

L'assorbanza A può essere determinata tramite la formula della legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

in cui:

ϵ è il coefficiente di assorbimento molare;

l è il cammino ottico cioè lo spessore in cm della soluzione attraversato dalla luce monocromatica;

C è la concentrazione della soluzione espressa in termini di molarità.

Il DNA assorbe luce alla lunghezza d'onda di 260nm (spettro dell'UV-VISIBILE).

6.4. AMPLIFICAZIONE MEDIANTE PCR

Una tipica miscela di PCR è costituita da:

DNA	300-400 ng
Buffer 10X	5 μ l
dNTPs 10 mM	1 μ l
100 μ M Primer forward	2 μ l
100 μ M Primer reverse	2 μ l
TAQ	1 U
H ₂ O	a volume finale di 50 μ l

Tabella 13. Sequenza primer EGFR e condizioni di PCR.

PRIMER	SEQUENZA	T _{ANN}	CICLI
esone 18 forward	AGGGCTGAGGTGACCCTTGT	64°	94° 4'; 35 cycles: 94° 15'', 64° 15'', 72° 30'';
esone 18 reverse	TCCCCACCAGACCATGAGAG		
esone 19 forward	ACCATCTCACAATTGCCAGTTAAC	58°	94° 4'; 35 cycles: 94° 15'', 58° 15'', 72° 30'';
esone 19 reverse	GAGGTTTCAGAGCCATGGACC		
esone 20 forward	CACACTGACGTGCCTCTCC	62°	94° 4'; 35 cycles: 94° 15'', 62° 15'', 72° 30'';
esone 20 reverse	TTATCTCCCCTCCCCGTATC		
esone 21 forward	TCACAGCAGGGTCTTCTCTGTTT	58°	94° 4'; 40 cycles: 94° 15'', 58° 15'', 72° 30'';
esone 21 reverse	ATGCTGGCTGACCTAAAGCC		

6.5. ELETTROFORESI SU GEL D'AGAROSIO

L'elettroforesi su gel d'agarosio si basa sul principio per il quale, applicando una corrente elettrica, il DNA carico negativamente migra verso il polo positivo. La visualizzazione del DNA (fino a 5-10 ng) si ottiene tramite Etidio Bromuro (0,5 µg/ml finale), agente intercalante che emette una luce fluorescente dopo eccitamento con raggi ultravioletti (UV).

Composizione del tampone di elettroforesi: si utilizza TBE. Il TAE ha una capacità tamponante abbastanza bassa ma ha un potere di risoluzione del DNA superavvolto migliore del TBE, il quale però ha un potere tamponante più elevato.

TBE 5X per 1 litro:	Tris base	54 g
	Acido borico	27.5 g
	EDTA	3.72 g

Diluire a 1X con acqua per il tampone di corsa.

Tampone di caricamento: è utile per aumentare la densità del campione facilitando così la discesa del DNA nei pozzetti e per conferire colore al campione. L'agente contenuto nel tampone ha un tasso di migrazione verso l'anodo noto. Il tampone da noi usato è così composto:

0.25% Blu di bromofenolo (Plusone)
15% Ficoll (Amersham Pharmacia Biotech AB)
in TBE 1X

Per visualizzare i frammenti di DNA, l'amplificato viene mescolato a 2 µl di tampone di caricamento (Loading Dye) e caricato su gel d'agarosio (Sigma) al 2% in TBE 1X e 0.5 µg/ml etidio bromuro. Si lascia avvenire la corsa a 100 V per circa 15 minuti, in presenza del marcatore di peso molecolare.

6.6. SEQUENZIAMENTO DI SANGER

Il sequenziamento del prodotto di PCR secondo il metodo di Sanger è un metodo di screening diretto che consente di conoscere in modo puntuale la successione in basi di un tratto genomico amplificato mediante PCR. Mentre in passato il sequenziamento veniva condotto con l'ausilio di isotopi radioattivi, attualmente la marcatura più utilizzata è quella che prevede l'utilizzo di terminatori di catena (big dye terminators) rappresentati dai quattro dideossinucleotidi marcati con molecole fluorescenti. I prodotti della marcatura vengono sottoposti ad elettroforesi capillare su apparecchiature automatizzate e ad alta processività collegate ad un laser per l'eccitazione dei fluorocromi e a un detector per la rilevazione della luce emessa. Le emissioni di luce vengono raccolte ed analizzate da una fotocamera digitale CCD (Coupled Charge Device) la quale trasferisce la sequenza delle emissioni in un grafico (elettroferogramma) costituito dalla successione di picchi di quattro differenti colori, ciascuno corrispondente all'emissione fluorescente di uno dei quattro fluorocromi. Il sequenziamento diretto è la tecnica sicuramente più diffusa e rappresenta il gold standard per evidenziare mutazioni puntiformi o frameshift, tuttavia non è quella in assoluto più sensibile; difficilmente una mutazione può essere evidenziata se presente in meno del 20% delle molecole di DNA analizzate.

Protocollo:

STEP 1: Purificazione dei frammenti di DNA

Prima di poter sequenziare è necessario sottoporre i frammenti di DNA a purificazione per eliminare dagli amplificati eventuali tracce della miscela di PCR, tra cui sali, nucleotidi o primer in eccesso. Il DNA amplificato viene quindi caricato su gel d'agarosio all'1% (0,5 µg/ml di etidio bromuro) e fatto correre in TAE per circa 20 minuti a 100V. Successivamente le bande relative ai frammenti di DNA vengono tagliate e inserite in apposite colonnine (Millipore) per purificare il DNA dopo esser sottoposto a centrifugazione a 5000 g per 10 minuti.

Il DNA così purificato può essere utilizzato per la reazione di sequenza ciclica.

STEP 2: PCR di Sequenza

I componenti della miscela di PCR sono:

-30-90 ng del frammento di DNA da sequenziare

-un primer omologo alla sua estremità 5'

-una miscela di deossinucleosidi trifosfati (dNTPs) e dideossinucleosidi trifosfati (ddNTPs) marcati con fluorescina legata a 4 diclororodamine con uno spettro di emissione diverso per ogni base (Tabella 14 e Figura 34).

-una DNA polimerasi termostabile derivata dalla *Thermus aquaticus* polimerase (Taq). E' un enzima con una stabilità termica maggiore rispetto alla forma nativa (emivita di 2,5 ore a 96-98 °C) e privo dell'attività esonucleasica 5'-3'.

I ddNTPs differiscono dai dNTPs per la mancanza di un gruppo ossidrilico (-OH) al 3', responsabile del legame con un altro nucleotide: ciò comporta un blocco della sintesi del DNA perché la polimerasi non riesce a procedere nell'allungamento del filamento. Per questo motivo si generano tanti piccoli frammenti di lunghezza differente.

Tabella 14. Fluorocromi utilizzati per marcare i terminatori della reazione di sequenza.

ddNTP	DICLORORODAMINA
A	Dichloro (R6G)
C	Dichloro (TAMRA)
G	Dichloro (R110)
T	Dichloro (ROX)

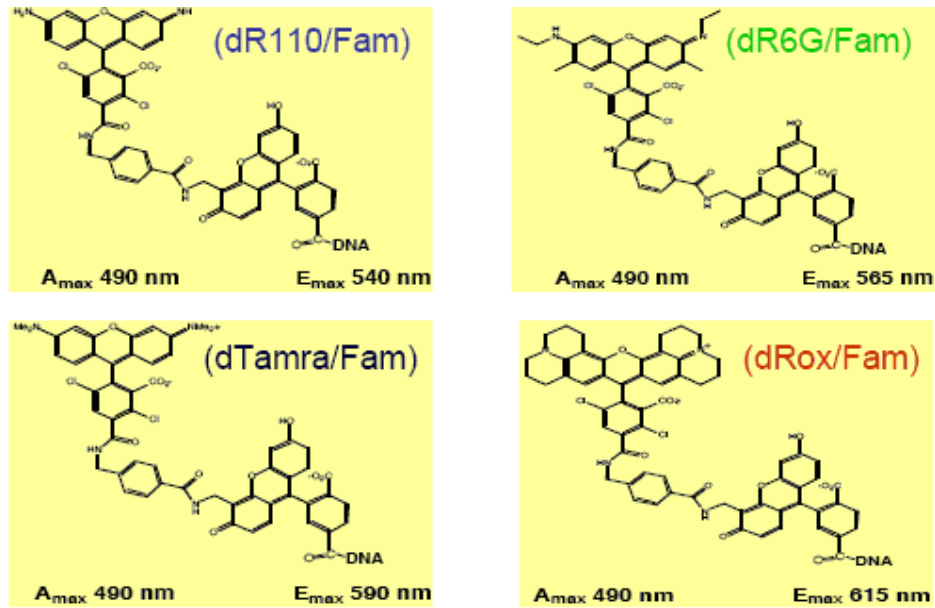


Figura 34. Fluorocromi utilizzati nel sequenziamento

La miscela di reazione preparata con il kit ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) è costituita da:

DNA templato	50 ng
Buffer 5X	2 μ l
Cycle sequencing mix	1 μ l
10 μ M di primer forward o reverse	1 μ l
H ₂ O a volume finale di 10 μ l	

La Cycle sequencing mix contiene la polimerasi, i dNTPs e i ddNTPs marcati.

La reazione viene fatta avvenire per 25 cicli.

Condizioni di PCR di sequenza:

96° per 4'	} per 25 cicli
50° per 15''	
60° per 4'	
4° infinito	

STEP 3: Purificazione dei campioni provenienti dalla reazione di sequenza

A causa del meccanismo di iniezione elettrocinetica impiegato, il campione proveniente dalla reazione di cycle sequencing deve essere totalmente privo di sali e di altre molecole cariche negativamente, perché questi andrebbero a competere con il DNA per l'ingresso nel capillare durante l'iniezione, con una conseguente perdita di segnale.

Inoltre proteine e detergenti potrebbero causare l'intasamento del capillare, con relativa perdita di risoluzione. Per evitare questi problemi è quindi necessario purificare i campioni provenienti dalla reazione di sequenza utilizzando il DyeEx 2.0 Spin kit (Quiagen) come segue:

- 1) Preparare le colonnine contenenti la resina miscelandole e centrifugandole a 750 g per 3 minuti
- 2) Caricare nella colonna la miscela ottenuta dalla PCR di sequenza. La resina è in grado di legare tutti i componenti della miscela di cycle sequencing tranne il DNA amplificato, che viene eluito per centrifugazione a 750 g per 3 minuti

Il DNA purificato così ottenuto viene caricato su sequenziatore ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

La sequenza ottenuta viene confrontata con quella originale depositata in banca dati (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) per ricercare il codone contenente l'alterazione genetica ed eventualmente la corrispondente sostituzione aminoacidica.

6.7. PIROSEQUENZIAMENTO

Il Pyrosequencing è un metodo di sequenziamento del DNA, realizzato appositamente per studiare gli SNPs (mutazioni puntiformi o polimorfismi a singolo nucleotide). Gli SNPs costituiscono il 90% delle variazioni di sequenza umane e rivestono un ruolo cruciale come fattori predittivi di rischio per alcune malattie multifattoriali. Il metodo del Pyrosequencing si basa sul dosaggio del pirofosfato liberato in seguito all'attacco di un dNTP al filamento polimerizzato. La tecnica consta di cinque passaggi principali. Nel primo passaggio la sequenza da analizzare, dopo essere stata amplificata, viene denaturata e incubata con gli enzimi DNA Polimerasi, ATP solforilasi, Luciferasi e Apirasi e con i substrati ASP (adenosinsolfosfato) e luciferina.

A questo punto viene aggiunto alla reazione uno dei quattro dNTP che verrà incorporato dalla DNA Polimerasi solo se complementare con il residuo del template; se ciò è vero si avrà liberazione di P_i (Pirofosfato inorganico), il quale verrà trasformato in ATP ad opera della solforilasi utilizzando l'ASP come substrato. L'ATP ottenuto consente la conversione della luciferina a ossiluciferina ad opera della luciferasi, concomitante alla produzione di un segnale luminoso che viene rilevato da un'apposita camera fotosensibile (CCD). L'enzima apirasi infine degrada il dNTP che non è stato incorporato e l'ATP in eccesso prodotto dalla solforilasi. Solo quando la degradazione è terminata, viene aggiunto un secondo dNTP per far progredire la reazione di polimerizzazione e così per tutti e quattro i dNTPs fino alla deduzione completa della sequenza. Per evitare falsi positivi, al posto dell'adenina si utilizza come dNTP l'adenosina-tio-trifosfato. Il segnale luminoso è poi registrato in un apposito pirogramma in cui l'altezza e l'area di ogni picco sono proporzionali all'intensità dell'emissione luminosa e quindi alla quantità di ATP prodotto (Voelkerding et al., 2009) (Figura 35).

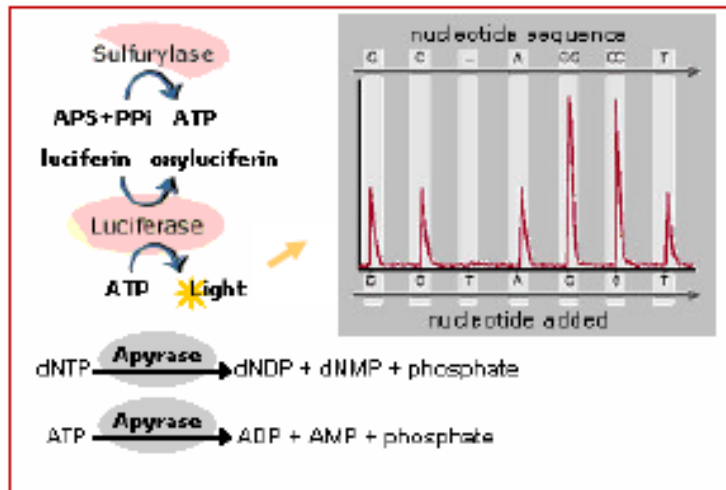


Figura 35. schema del metodo di sequenziamento del DNA mediante Pyrosequenziamento

EGFR TKI response (sensitivity)

Il kit "EGFR TKI response (sensitivity)" consente di identificare tutte le principali varianti del codone 719 dell'esone 18 e dei codoni 858 e 861 dell'esone 21 del gene EGFR (tra cui G719S, G719C, G719A, G719D, L858R, L861Q) e di rilevare tutte le principali delezioni che interessano i codoni da 746 a 750 dell'esone 19 del gene EGFR, che possono influenzare la sensibilità alla terapia del NSCLC con inibitori del dominio tirosinchinasico del recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR TKI).

EGFR TKI response (resistance)

Il kit "EGFR TKI response (resistance)" permette la determinazione delle principali mutazioni del gene EGFR associate alla resistenza agli inibitori tirosinchinasici di EGFR. Il kit consente di identificare le principali varianti dei codoni 768, 769, 790 dell'esone 20 di EGFR (S768I, V769L e T790M) e le principali inserzioni che interessano i codoni da 770 a 772. L'uso del kit è utile nelle fasi preliminari della terapia per individuare pazienti potenzialmente non responders, o meno sensibili, agli inibitori tirosinchinasici di EGFR. Mentre l'utilizzo di questo kit nelle fasi più avanzate della terapia è fondamentale per stabilire se il paziente sta acquisendo refrattarietà a gefitinib/erlotinib.

STEP 1- AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE REAL-TIME

Previa amplificazione del DNA estratto da tessuto tumorale su “Rotor-Gene Q” (Qiagen) (Figura 36), la genotipizzazione e la quantificazione allelica delle singole mutazioni avvengono tramite “Pyrosequencing”.



Figura 36. “Rotor-Gene Q” (Qiagen)

Il Rotor-Gene è uno strumento per l’amplificazione degli acidi nucleici basato su un innovativo sistema a rotore che consente un’ottimale uniformità ottica e termica tra i campioni, fattore critico per qualunque tipo di analisi.

Attraverso l’utilizzo di tre diverse miscele di primers, si ottengono per i codoni analizzati tre specifici frammenti comprendenti i siti polimorfici.

Protocollo:

Accendere lo strumento almeno 20 minuti prima dell’avvio della reazione.

I quattro test condividono il medesimo profilo termico, pertanto la relativa amplificazione end-point può essere eseguita contemporaneamente sullo stesso strumento.

Preparare, per ogni campione e per ogni controllo di amplificazione, una miscela di amplificazione (Tabella 15) comune ai quattro test (Master Amp-Mix), secondo il seguente schema:

Tabella 15. Miscela di amplificazione EGFR ex 18, 19, 20 e 21

Master Amp-mix	Test EGFR ex 18, 19 e 20	Test EGFR ex 21
Takara 5X R-PCR Buffer (Mg ²⁺ free)	10	10
Takara dNTP Mixture (10mM of each dNTP)	1	1
Takara Ex Taq HS (5U/ μ L)	0,3	0,3
EvaGreen Dye (20X in water)	2,5	2,5
Takara 50 mM Mg ²⁺ Solution	1,5	1
EGFR ex 18 primers 24/ EGFR ex 19 primers 24/ EGFR ex 21 primers II 24	1	1
WATER	28,7	29,2

Mescolare accuratamente le quattro Amp-Mix vortexandole velocemente, quindi centrifugare brevemente prima di dispensarle.

Dispensare 45 μ L di ciascuna Amp-Mix nelle rispettive provette di reazione adeguatamente contrassegnate.

Per ciascuno dei quattro test aggiungere nelle rispettive provette:

controllo negativo: 5 μ L di WATER

campioni: 5 μ L di DNA estratto

controllo positivo: 5 μ L di Control DNA wt

volume totale di reazione: 50 μ L.

trasferire tutte le provette sul Rotor-Gene e completare le posizioni libere del rotore con provette vuote dello stesso tipo di quelle usate per la reazione di amplificazione.

Seguire le istruzioni contenute nel manuale dello strumento per impostare il seguente profilo termico di amplificazione (Tabella 16) e Gain 6 per l'acquisizione del segnale Green:

Tabella 16. Profilo termico di amplificazione EGFR esone 18, 19, 20 e 21.

Hold 1	95°C per 3 minuti
37 cicli	95°C per 30 secondi/56°C per 30 secondi/72°C per 30 secondi
Hold 2	60°C per 5 minuti
5 cicli	60°C per 20 secondi (acquisizione del segnale nel canale Green)

STEP 2- PREPARAZIONE DEL CAMPIONE E REAZIONE DI PYROSEQUENCING

Per la determinazione delle mutazioni negli esoni 18, 19 e 21 del gene EGFR si procede al sequenziamento dei prodotti di amplificazione con lo strumento "PyroMark Q96 ID" (Qiagen).

- Accendere il PyroMark ID 90 minuti prima di iniziare la corsa per permettere alla camera CCD di stabilizzarsi.
- Accendere il blocco termostato ed impostare la temperatura di 80°C prevista per la fase di annealing dei primers di sequenziamento.
- Impostare l'ordine di dispensazione dei campioni nella Sample preparation Plate utilizzando l'apposita funzione del PyroMark ID sw e stampando il fac-simile della piastra impostata.
- Risospendere gli enzimi ed i substrati liofilici in 620µL di MB water agitandoli delicatamente senza l'utilizzo del vortex ed attendere almeno 10 minuti prima di dispensarli per essere certi della completa risospensione.

- Impostare le SNP Entries per ogni test secondo il seguente schema:

Test	Entry ID	Sequenza da analizzare	Ordine di dispensazione
EGFR ex 18 Codone 719 pos 1-2	EGFR ex 18 G719C-S/D	GCC/A/TCAGCACTTTGA	TGCATCATGCAC
EGFR ex 19 del	EGFR ex 19 E746-A750 del	A[GGAATTAAGAGAAGC] AACATCTCCGAAA	TAGATAGAGAG CACAGTCTC
EGFR ex 21 Codoni 861 e 858 pos 2	EGFR ex 21 L861Q L858R	AGCA/TGTTTGGCCA/C GCCCAAATCTGTG	CAGCATCGTGC ACG
EGFR ex 20 Codone 768 pos 2, codone 769 pos 1, codone 771 GGT ins	EGFR ex 20 S768I V769L G771ins	GTGATGGCCAG/TCG/TT GGAC[GGT]AACCCCCAC	CGTGATGCTACG TCGTGACGTGA
EGFR ex 20 Codone 790 pos 2	EGFR ex20 T790M	C/TGCAGCTCA	ACTAGCAGC

- Impostare la SNP Run
- Prendere nota dei volumi dei Pyro Reagents, cioè dei volumi di E-mix (enzimi), S-mix (substrati) e dei nucleotidi (A, C, G, T) che appaiono nel Web browser area.

STEP 3- IMMOBILIZZAZIONE DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE SULLE BIGLIE DI SEFAROSIO

Immobilizzare i prodotti di amplificazione biotinilati sulle biglie di sefarosio ricoperte di streptavidina ("Streptavidin Sepharose High Performance", GE Healthcare Bio-Science AB) effettuando i seguenti passaggi a temperatura ambiente:

- agitare il contenitore con le biglie di sefarosio fino ad ottenere una soluzione omogenea.
- Preparare la miscela di immobilizzazione (Bindin-Mix), secondo il seguente schema:

Binding-Mix	Volume reagente per 1 reazione (µL)
MB water	20
SEQ binding buffer	37
Biglie di sefarosio	3
Volume Totale	60

- Mescolare per inversione la Binding-Mix e dispensarne 60µL in ciascuno dei rispettivi pozzetti della Sample preparation plate che si vogliono utilizzare.
- Aggiungere nei rispettivi pozzetti, per ciascuno dei quattro test e secondo l'ordine definito nella Sequencing grid:

20µL di amplificato da campioni clinici

20µL di amplificato da controllo positivo di amplificazione Control DNA wt

20µL di amplificato da controllo negativo di amplificazione WATER

Volume totale di Binding-Mix più prodotto di amplificazione: 80µL

Coprire i pozzetti della Sample preparation plate con un Sample preparation foil.

Mettere la sample preparation plate in agitazione per 15 minuti a 1400rpm.

STEP 4- PREPARAZIONE DELLA PIASTRA PER IL SEQUENZIAMENTO

- Preparare le miscele di sequenziamento (Annealing-Mix), una per ognuno dei tre test (EGFR ex 18, EGFR ex 19del e EGFR ex 21), secondo il seguente schema:

Annealing-Mix	Volume reagente per 1 reazione (µL)
SEQ annealing buffer	38
EGFR ex 18 seq primer 48/ EGFR ex 19-del seq primer 48/ EGFR ex 21 seq primer 48 EGFR ex 20 S768I-ins seq primer 48/ EGFR ex 20 T790M seq primer 48	2
Volume totale	40

- Mescolare accuratamente le Annealing-Mix preparate pipettando ripetutamente.
- Dispensare 40µL di ciascuna delle quattro Annealing-Mix in ciascuno dei rispettivi pozzetti della PyroMark Q96 Plate Low (Qiagen).

Le posizioni dei pozzetti corrispondono a quelle occupate dai prodotti di amplificazione nella Sample preparation plate durante l'immobilizzazione e definite nella Sequencing grid.

STEP 5- DENATURAZIONE DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE IMMOBILIZZATI

L'esecuzione di questa fase richiede l'utilizzo del sistema accessorio "PyroMark Q96 Vacuum Workstation" (Qiagen) (Figura 37) composto da:

- Vacuum Prep Worktable
- Vacuum Prep Tool
- Vacuum pump

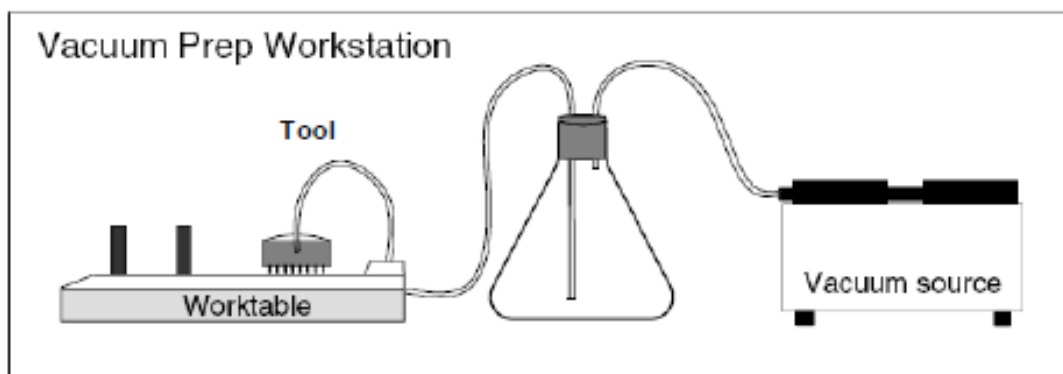


Figura 37. PyroMark Q96 Vacuum Workstation (Qiagen)

Data la tendenza delle biglie a sedimentare velocemente, per garantire una buona cattura delle stesse, è necessario che non sia trascorso più di un minuto dalla fine dell'agitazione della Sample preparation plate.

- Inserire le cinque vaschette nelle rispettive posizioni del Worktable.
- Versare 180 ml di Etanolo 70%, SEQ washing buffer e SEQ water rispettivamente nelle vaschette "Ethanol", "Washing buffer" e "Water".
- Versare 120 ml di SEQ denaturation solution nella vaschetta apposita.
- Versare 150 ml di SEQ water nella vaschetta "Parking Position Water".

- Rimuovere molto delicatamente il Sample preparation foil dalla Sample preparation plate al fine di evitare eventuali cross-contaminazioni da amplicone tra un pozzetto e l'altro, ripiegarlo su se stesso e smaltirlo immediatamente.
- Posizionare la sample preparation plate e la Plate Low rispettivamente nelle posizioni "PCR plate" e "PSQ plate".
- Accendere la pompa e successivamente applicare il vuoto al Tool.
- Lavare i filtri del Tool immergendoli nella "Parking position water" per circa 20 secondi.
- Catturare le biglie di sefarosio introducendo il Tool delicatamente nella Sample preparation plate.
- Aspirare completamente il liquido da tutti i pozzetti per immobilizzare tutte le biglie sulla punta dei filtri.
- Spostare il Tool nella vaschetta con Etanolo 70% e far fluire la soluzione attraverso i filtri del tool per 5 secondi.
- Spostare il Tool nella vaschetta con SEQ denaturation solution e far fluire la soluzione attraverso i filtri del tool per 5 secondi.
- Spostare il Tool nella vaschetta con SEQ washing buffer e far fluire la soluzione attraverso i filtri del tool per 5 secondi.
- Sollevare il tool per alcuni secondi in posizione verticale, con inclinazione maggiore di 90°, per permettere al liquido di essere completamente aspirato.
- Togliere il vuoto al Tool.
- Trasferire il Tool nella piastra di sequenziamento Plate Low e agitarlo delicatamente in modo da favorire il completo rilascio delle biglie di sefarosio nei pozzetti della piastra.
- Spegnerla pompa.
- Coprire la Sample preparation plate con un Waste foil e smaltirla immediatamente.
- Riporre il Tool nella vaschetta "Parking position water" (Figura 38) .



Figura 38. PyroMark Q96 Vacuum WorkStation (Qiagen)

STEP 6- ANNEALING DEL PRIMER DI SEQUENZIAMENTO

EGFR esone 18, 19 e 21:

- porre la Plate Low con i campioni sulla Thermoplate Low ed incubare su blocco termostato ad 80°C (+/- 2°C) per 2 minuti.
- Rimuovere la Plate Low dalla Thermoplate Low e lasciarla raffreddare a temperatura ambiente per 5 minuti.
- Porre la Plate Low nell'apposito alloggiamento del PyroMark ID e procedere con la reazione di sequenziamento.

EGFR esone 20:

- porre la Plate Low con i campioni sulla Thermoplate Low ed incubare su blocco termostato ad 90°C (+/- 2°C) per 2 minuti.
- Spostare immediatamente la Plate Low con i campioni sulla seconda Thermoplate Low ed incubare sul secondo blocco termostato a 55°C (+/- 2°C) per 10 minuti.
- Rimuovere la Plate Low dalla Thermoplate Low e lasciarla raffreddare a temperatura ambiente per 5 minuti.
- Porre la Plate Low nell'apposito alloggiamento del PyroMark ID e procedere con la reazione di sequenziamento.

STEP 7 - CARICAMENTO DELLA CARTUCCIA

Dispensare i "PyroMark Gold Q96 Reagents" (Qiagen) nelle posizioni predefinite della "PyroMark Q96 Cartridge" (Qiagen) (Figura 39), disposta con l'etichetta rivolta verso l'operatore.

Dispensare i reagenti lentamente secondo lo schema riportato sotto:

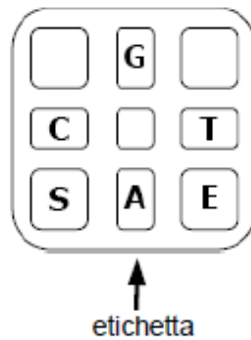


Figura 39. PyroMark Q96 Cartridge (Qiagen): A, C, T, G: nucleotidi; E: Enzima; S: Substrato

- Caricare la cartuccia nello strumento
- Avviare la SNP run.
-

STEP 8 – ANALISI DEI RISULTATI

- Analizzare separatamente i campioni in base alle Entry con cui sono stati processati.

In “Well overview” valutare per ogni test il risultato del rispettivo controllo positivo e negativo di amplificazione. Generalmente il colore dei pozzetti dei controlli positivi di amplificazione è blu (“Passed”) o giallo (“Check”). Il colore dei pozzetti dei controlli negativi è rosso (“Failed”).

Accertarsi che il colore dei pozzetti dei campioni clinici sia blu o giallo con le seguenti eccezioni:

- Per il test EGFR ex 18, in presenza di mutazioni secondarie, il colore del pozzetto potrebbe essere rosso.
- Per il test EGFR ex 19 del, in presenza di una delezione diversa da 2235-2249del, il colore del pozzetto potrebbe essere rosso.
- Per il test EGFR ex 20, il pozzetto potrebbe essere rosso in presenza di mutazioni secondarie non analizzate dalle SNP entries impostate.
 - Eseguire la quantificazione allelica di un campione alla volta analizzando il programma.
 - Confrontare il programma ottenuto per i campioni clinici con quello rappresentante la sequenza wild-type del controllo positivo.

Per l’assegnazione diretta del genotipo riferirsi, a seconda della frequenza allelica ottenuta, alla sezione <MIN% oppure >MAX% della tabella sottostante.

Per MIN-MAX% si intendono le frequenze alleliche che cadono all’interno dell’intervallo di indeterminatezza, specifico per ogni mutazione.

Entry EGFR ex 18 G719C-S/D

Allele mutato	Intervallo di indeterminazione della frequenza degli alleli mutati (MIN-MAX%)
T cod 719 pos 1/2	3-5%
A cod 719 pos 1	8-12%

Entry EGFR ex 18 G719A

Allele mutato	Intervallo di indeterminazione della frequenza degli alleli mutati (MIN-MAX%)
G cod 719 pos 2	8-12%

Entry EGFR ex 21 L861Q L858R

Allele mutato	Intervallo di indeterminazione della frequenza degli alleli mutati (MIN-MAX%)
T cod 861 pos 2	4-5%
C cod 858 pos 2	2-3%

Entry EGFR ex 20 S768I V769L G771 ins

Allele mutate	Intervallo di indeterminazione della frequenza degli alleli mutati (MIN-MAX%)
T cod 768 pos 2	5-10%
C cod 769 pos 1	3-5%
I cod 771 GGT ins	5-10%

Entry EGFR ex 20 T790M

Allele mutato	Intervallo di indeterminazione della frequenza degli alleli mutati (MIN-MAX%)
T cod 790 pos 2	3-5%

Frequenza allelica	Risultato
<MIN%	Il campione è EGFR wild-type La frequenza dell'allele mutato è inferiore al limite di sensibilità del sistema inteso nel suo insieme (selezione materiale + estrazione + amplificazione + pyrosequencing)
>MAX%	Il campione presenta una mutazione nello specifico esone/codone/posizione di EGFR
MIN-MAX%	Ripetere l'amplificazione in triplo e sequenziale ognuno dei tre replicati.

- La Entry EGFR ex 18 G719C-S/D, da eseguire in prima battuta, permette di analizzare le mutazioni G719S/D e G719C nelle prime due posizioni del codone 719 di EGFR, che, considerate insieme, sono le più frequenti in questo codone.
- La Entry EGFR ex 19 E746-A750 del permette di analizzare le delezioni, semplici o complesse, che interessano la regione della sequenza codificante (CDS) compresa tra il nt 2234 e il nt 2250.

In caso di delezioni nella regione a valle del nt 2250, il programma potrebbe subire delle variazioni nelle altezze dei picchi di riferimento senza però generare una percentuale di D>20%. In tal caso, confrontare il programma ottenuto per i campioni clinici con quello rappresentante la sequenza wild-type del controllo positivo.

Per l'analisi di tali variazioni è necessario utilizzare metodologie alternative (sequenziamento automatico).

- La Entry EGFR ex 20 S768I V769L G771ins, da eseguire in prima battuta, permette di analizzare le mutazioni nella seconda posizione del codone 768, nella prima posizione del codone 769 e la presenza dell'inserzione G771.

6.8. ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA

L'immunoistochimica è una tecnica che permette di visualizzare attraverso microscopio ottico l'espressione di componenti cellulari appartenenti a tessuti, strisci o citocentrifugati. Il metodo si basa sul riconoscimento dell'antigene bersaglio da parte dell'anticorpo ad esso specifico.

Esistono due metodi di rivelazione dell'antigene: diretto e indiretto.

Nel metodo diretto l'anticorpo primario che lega l'antigene deve essere coniugato a un marcatore: è disponibile un'ampia varietà di coniugati come fluorocromi (fluoresceina, rodamina), enzimi (perossidasi, fosfatasi alcalina, β -galattosidasi) o sostanze elettrondense (oro colloidale).

Nel metodo indiretto l'anticorpo primario utilizzato non è coniugato: successivamente il complesso antigene – anticorpo che si è formato viene fatto reagire con immunoglobuline di una specie animale diversa da quella in cui è stato prodotto l'anticorpo primario e coniugate con una molecola di marcatore. Generalmente il marcatore è un enzima, il quale in presenza dell'opportuno substrato produce un precipitato colorato nel sito di reazione, visualizzabile al microscopio ottico.

Il sistema di rivelazione da noi utilizzato (Mach4, Biocare Medical) consiste in un polimero legato all'anticorpo secondario e coniugato all'enzima perossidasi, che catalizza una reazione tra il substrato 3,3-diaminobenzidina tetraidrocloreuro (DAB) e il perossido di idrogeno (H₂O₂).

Il prodotto della reazione è la riduzione del perossido di idrogeno e l'ossidazione del substrato, da cui consegue una colorazione marrone del tessuto che ha reagito.

Per ogni caso selezionato, fissato in formalina neutra tamponata (Medite) e successivamente incluso in blocchetti di paraffina (Kendal Paraplast), vengono allestite 2 sezioni da 2 µm ciascuna, sulle quali effettuare le analisi immunoistochimiche per i due anticorpi, secondo protocollo.

Protocollo:

- Pretrattare il tessuto con EDTA (Bio-Optica) in bagnetto a 98°C per 25 minuti;
- Lasciar raffreddare poi lavare 2 volte con PBS 1X 0,05% Tween-20 per 1 minuto;
- Circondare la sezione di tessuto mediante PAP PEN (DIAPATH) in modo che i reagenti che verranno successivamente depositati restino confinati in una precisa area del vetrino;
- Trattare i vetrini al buio per 20 minuti con Peroxidase I (Biocare Medical) allo scopo di bloccare le perossidasi endogene;
- Lavare 2 volte con PBS 1X 0,05% Tween-20 per 1 minuto;
- Background Sniper (Biocare Medical) per 15 min per il blocco dei siti aspecifici;
- Lavare 2 volte con PBS 1X 0,05% Tween-20 per 1 minuto;
- Incubare 1 ora con 200 µl di anticorpo primario a concentrazioni descritte in Tabella 17;
- Lavare 2 volte con PBS 1X 0,05% Tween-20 per 1 minuto;
- Incubare 30 minuti con 200 µl di anticorpo secondario (Mach4, Biocare Medical);
- Lavare 2 volte con PBS 1X 0,05% Tween-20 per 1 minuto;
- Incubare 5 minuti con il substrato DAB al buio (Betazoid DAB Substrate + Betazoid DAB Chromogen, Biocare Medical). Essendo la DAB un substrato fotosensibile viene preparata al momento diluendo 1 goccia di DAB in 1 ml del suo Buffer;
- Lavare in H₂O distillata e contro-colorare i nuclei per 1 minuto in ematossilina;
- Sciacquare in acqua corrente e disidratare mediante immersioni sequenziali di 2 minuti in etanolo al 70%, in etanolo al 90% e due volte in etanolo al 100%;
- Immergere per 3 volte ciascuna di 5 minuti i vetrini in xilene e montare con coprioggetto 25 X 50 mm (Pasquali) deponendo su esso una goccia di montante oleoso (Micromount,

DIAPATH), cercando di eliminare le eventuali bolle d'aria che possono formarsi attraverso una leggera pressione esercitata sul coprioggetto.

Tabella 17. Informazioni tecniche relative agli anticorpi utilizzati

	Fonte	Codice	Origine	Diluizione	Pretrattamento	Sistema di Rivelazione
EGFR ex 19 E746-A750del	Cell Signaling	2085S	Rabbit	1:200	EDTA	MACH4 (Biocare Medical)
EGFR ex 21 L858R	Cell Signaling	3197S	Rabbit	1:100	EDTA	MACH4 (Biocare Medical)

VALUTAZIONE DEI PREPARATI ISTOLOGICI

Al termine dell'indagine immunohistochimica si analizzano i vetrini per valutare i livelli di positività della reazione. Utilizzando il microscopio ottico (ingrandimento 10X) si valutano le sezioni in termini di percentuale di cellule tumorali risultate positive.

Si considera positivo un campione con almeno il 10% delle cellule tumorali immunocolorate (Figura 40).

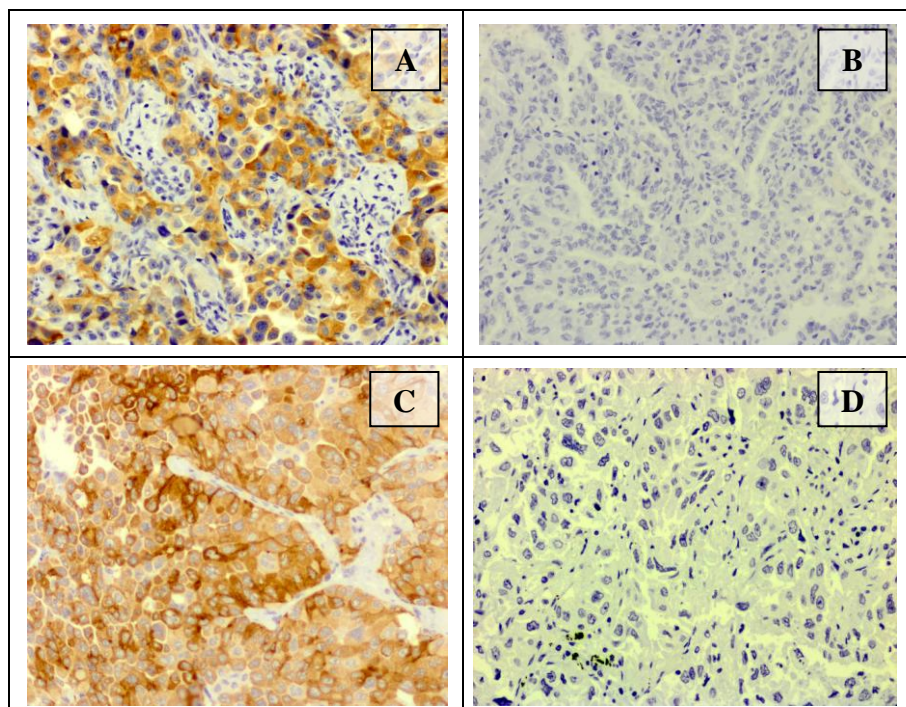


Figura 40. A e B. Colorazione immunohistochimica eseguita con l'anticorpo Anti- EGFR esone 19 [E746-A750 deletion specific (6B6)]. A. caso mutato al pirosequenziamento; B. caso wt al pirosequenziamento; C e D. colorazione immunohistochimica eseguita con l'anticorpo Anti EGFR esone 21 [L858R mutant-specific (43B2)]. C. caso mutato al pirosequenziamento; D. caso wt al pirosequenziamento.

7. BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Jemal et al. Cancer Statistics 2010; American Cancer Society
- ² Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. CA Cancer J Clin. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. doi: 10.3322/caac.20107. Epub 2011 Feb 4. Erratum in: CA Cancer J Clin. 2011 Mar-Apr;61(2):134. Global cancer statistics.
- ³ Thun MJ, Henley SJ, Burns D, Jemal A, Shanks TG, Calle EE. Lung cancer death rates in lifelong nonsmokers. J Natl Cancer Inst 2006; 98:691-699
- ⁴ Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. Cancer statistics, 2006. CA Cancer J Clin 2006; 56:106-130
- ⁵ Franceschi S, Bidoli E. The epidemiology of lung cancer. Ann Oncol 1999; 10 (Suppl 5):S3-6
- ⁶ Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1997. CA Cancer J Clin 1997; 47:5-27
- ⁷ AIRT Working Group, Italian cancer figures-report 2006: 1. Incidence, mortality and estimates. Epidemiol Prev 2006; 30 (1 Suppl 2): 105-106. English, Italian
- ⁸ Mountain CF. The international system for staging lung cancer. Semin Surg Oncol 2000; 18:106-115
- ⁹ Corrin B. Pathology of the lungs, 1st edition. London: Churchill Livingstone, 2000
- ¹⁰ International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol 83: Tobacco Smoking and Involuntary Smoking. IARC, Lyon France 2003
- ¹¹ Mountain CF. The international system for staging lung cancer. Semin Surg Oncol 2000; 18:106-115

¹² Corrin B. Pathology of the lungs, 1st edition. London: Churchill Livingstone, 2000

¹³ Travis WD, Garg K, Franklin WA, Wistuba II, Sabloff B, Noguchi M, Kakinuma R, Zakowski M, Ginsberg M, Padera R, Jacobson F, Johnson BE, Hirsch F, Brambilla E, Flieder DB, Geisinger KR, Thunnisen F, Kerr K, Yankelevitz D, Franks TJ, Galvin JR, Henderson DW, Nicholson AG, Hasleton PS, Roggli V, Tsao MS, Capuzzo F, Vazquez M. Evolving concepts in the pathology and computed tomography imaging of lung adenocarcinoma and bronchioloalveolar carcinoma . J Clin Oncol 2005; 23:3279-3287

¹⁴ Terzi A, Pelosi G, Falezza G, Lonardon A, Pasini F, Calabro F. Early hilar lung cancer-clinical aspects and long term survival. Identification of a subgroups of stage IA patients with more favorable prognosis. Lung Cancer 2000; 27:119-124

¹⁵ Hirsch FR, Franklin WA, Gazdar AF, Bunn PA. Early detection of lung cancer: clinical perspectivea of recent advances in biology and radiology. Clin Cancer Res 2001; 7:5-22

¹⁶ Wistuba II, Gazdar AF . Lung cancer preneoplasia. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease 2006; 1:331-348

¹⁷ Han AJ, Xiong M, Gu YY, Lin SX. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung with a better prognosis. A clinicopathologic study of 32 cases. Am J Pathol 2001; 115:841-850

¹⁸ Oyoda A, Hiroshima K, Toyozaki T, Haga Y, Fujisawa T, Ohwada H. Clinical characterization of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma and large cell carcinoma with neuroendocrine morphology. Cancer 2001; 91:1992-2000

¹⁹ Codignola AS, Tononi P, Cattaneo MG et al. Serotonine realease and cell proliferation are under the control of alpha-bunfarotoxin-sensitive nicotinic recepotors in small cell lung carcinoma cell lines. FEB S 1994; Lett 342: 286, 1994

-
- ²⁰ Hirsch Fr, Matthews MJ, Aimer S et al. Histopathologic classification of small cell lung cancer: changing concepts and terminology. *Semin Oncol* 1989; 15;215.
- ²¹ Elias A, Ibrahim J, Skarin AT et al. Dose-intensive therapy for limited-stage small-cell lung cancer: Long-Term outcome. *J Clin Oncol* 1999;
- ²² Fontana RS, Sanderson DR, Taylor WF et al. Early lung cancer detection: results of the initial (prevalence) radiologic and cytologic screening in the Mayo Clinic Study. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130:561-565
- ²³ Boucot KR, Weiss W. Is curable lung cancer detected by semiannual screening? *JAMA* 1973; 224:1361-1365
- ²⁴ Gartenschlager M, Schweden F, Gast K, Westermeier T, Kauczor H, von Zitzewitz H, Thelen M . Pulmonary nodules: detection with low-dose vs conventional-dose spiral CT. *Eur Radiol* 1998; 8(4):609-614
- ²⁵ Rusinek H, Naidich DP, McGuinness G, Leitman BS, McCauley DI, Krinsky GA, Clayton K, Cohen H . Pulmonary nodule detection: low-dose versus conventional CT. *Radiology* 1998; 209(1):243-249
- ²⁶ Fischbach F, Knollmann F, Griesshaber V et al. Detection of pulmonary nodules by multislice computed tomography: improved detection rate with reduced slice thickness. *Eur Radiol* 2003; 13:2378-2383
- ²⁷ Diederich S, Lentschig MG, Winter F, Roos N, Bongartz G . Detection of pulmonary nodules with overlapping vs non-overlapping image reconstruction at spiral CT. *Eur Radiol* 1999; 9(2):281-286
- ²⁸ Henschke CI, Yankelevitz DF, Naidich DP et al. CT screening for lung cancer: suspiciousness of nodule according to size on baseline scans. *Radiology* 2004; 231:164-168

-
- ²⁹ Yankelevitz DF, Reeves A, Kostis W et al. Determination of malignancy in small pulmonary nodules based on volumetrically determined growth rates: preliminary results. *Radiology* 2000; 217:251-256
- ³⁰ Henschke CI, Naidich DP, Yankelevitz DF et al. Early Lung Cancer Action Project: initial findings on repeat screenings. *Cancer* 2001; 92:153-159
- ³¹ Henschke CI, Yankelevitz DF, Mirtcheva R, McGuinness G, McCauley DI, Miettinen OS. CT screening for lung cancer: Frequency and significance of part-solid and nonsolid nodules. *AJR* 2002; 178:1053-1057
- ³² Diederich S, Hansen J, Wormanns D. Resolving small pulmonary nodules: CT features. *Eur Radiol* 2005; 15:2046-2049
- ³³ Li F, Sone S, Abe H, Macmahon H, Doi K. Malignant versus benign nodules at CT screening for lung cancer: comparison of thin-section CT findings. *Radiology* 2004; 233:793-798
- ³⁴ Seemann MD, Seeman O, Luboldt W et al. Differentiation of malignant from benign solitary pulmonary lesions using chest radiography, spiral CT and HRCT. *Lung Cancer* 2000; 29:105-124
- ³⁵ Gould MK, Maclean CC, Kuschner WG, Rydzak CE, Owens DK. Accuracy of positron emission tomography for diagnosis of pulmonary nodules and mass lesions: a meta-analysis. *JAMA* 2001; 285:914-924
- ³⁶ Swensen SJ, Viggiano RW, Midthun DE et al. Lung nodule enhancement at CT: multicentric study. *Radiology* 200; 214:73-80
- ³⁷ Jeong YJ, Lee KS, Jeong SY, Chung MJ, Shim SS, Kim H, Kwon OJ, Kim S. Solitary pulmonary nodule: characterization with combined wash-in and washout features at dynamic multi-detector row CT. *Radiology* 2005; 237(2):675-683

-
- ³⁸ Michael JW et al. CT -guided percutaneous Fine-Needle Aspiration Biopsy of small (≤ 1 cm) pulmonary lesions. *Radiology* 2002; 225:823-828
- ³⁹ Libby DM, Smith JP, Altorki NK, Pasmantier MW, Yankelevitz D, Henschke CI. Managing the Small Pulmonary Nodule Discovered by CT. *Chest* 2004; 125:1522-1529
- ⁴⁰ MacMahon H, Austin JH, Gamsu G, Herold CJ, Jett JR, Naidich DP, Patz EF Jr, Swensen SJ ; Fleischner Society . Guidelines for management of small pulmonary nodules detected on CT scans: a statement from the Fleischner Society. *Radiology* 2005; 237(2):395-400
- ⁴¹ Strand, TE, Rostad H, Damhuis RA, Norstein J (giugno 2007). Risk factors for 30-day mortality after resection of lung cancer and prediction of their magnitude. *Thorax* 62: 991.
- ⁴² Dionigi, Basi teoriche e Chirurgia generale - Chirurgia specialistica (4^a edizione), Padova, Elsevier Masson, 2006. ISBN 978-88-299-1654-2
- ⁴³ El-Sherif, A, Gooding WE, Santos R et al. (agosto 2006). Outcomes of sublobar resection versus lobectomy for stage I non-small cell lung cancer: a 13-year analysis. *Annals of Thoracic Surgery* 82 (2): 408–415.
- ⁴⁴ Fernando, HC, Santos RS, Benfield JR et al. (febbraio 2005). Lobar and sublobar resection with and without brachytherapy for small stage IA non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 129 (2): 261–267. DOI:10.1016/j.jtcvs.2004.09.025. PMID =15678034.
- ⁴⁵ Casali G, Walker WS (marzo 2009). Video-assisted thoracic surgery lobectomy: can we afford it?. *Eur J Cardiothorac Surg* 35 (3): 423–8. DOI:10.1016/j.ejcts.2008.11.008
- ⁴⁶ Clegg, A, Scott DA, Hewitson P, et al. (gennaio 2002). Clinical and cost effectiveness of paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, and vinorelbine in non-small cell lung cancer: a systematic review. *Thorax* 57 (1): 20–28.

⁴⁷ Winton, T, Livingston R, Johnson D, et al. (giugno 2005). Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine* 352 (25): 2589–2597.

⁴⁸ Douillard, JY, Rosell R, De Lena M et al. (settembre 2006). Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncology* 7 (9): 719–727.

⁴⁹ Tsuboi, M, Ohira T, Saji H et al. (aprile 2007). The present status of postoperative adjuvant chemotherapy for completely resected non-small cell lung cancer. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 13 (2): 73–77.

⁵⁰ Horn, L, Sandler AB, Putnam JB Jr, Johnson DH (maggio 2007). The rationale for adjuvant chemotherapy in stage I non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 2 (5): 377–383.

⁵¹ Wakelee, HA, Schiller JH, Gandara DR (luglio 2006). Current status of adjuvant chemotherapy for stage IB non-small-cell lung cancer: implications for the New Intergroup Trial. *Clinical Lung Cancer* 8 (1): 18–21.

⁵² *British Medical Journal, Clinical evidence concise: the international resource of the best available evidence for effective health care*, 14^a ed., Londra, BMJ Publishing Group, dicembre 2005, 486–488.

⁵³ R Arriagada; Goldstraw P, Le Chevalier T, *Oxford Textbook of Oncology*, 2^a ed., Oxford University Press, 2002, pp. 2094

⁵⁴ 2005). Postoperative radiotherapy for non-small cell lung cancer. *Cochrane database of systematic reviews (Online)* (2): CD002142.

-
- ⁵⁵ Lally, BE, Zelterman D, Colasanto JM et al. (luglio 2006). Postoperative Radiotherapy for Stage II or III Non–Small-Cell Lung Cancer Using the Surveillance, Epidemiology, and End Results Database. *Journal of Clinical Oncology* (John Wiley & Sons) 24 (19): 2998–3006.
- ⁵⁶ Raben, A, Mychalczak B (ottobre 1997). Brachytherapy for non-small cell lung cancer and selected neoplasms of the chest. *Chest* 112 (Suppl. 4): 276–286S
- ⁵⁷ Celebioglu, B, Gurkan OU, Erdogan S et al. (novembre 2002). High dose rate endobronchial brachytherapy effectively palliates symptoms due to inoperable lung cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 32 (11): 443–448
- ⁵⁸ J. Baselga et al, “Phase I Safety, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Trial of ZD1839, a Selective Oral Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Five Selected Solid Tumor Types”, *Journal of Clinical Oncology*, vol. 20, n° 21, pp. 4292-4302, 2002
- ⁵⁹ R. S. Herbst et al, “Selective Oral Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor ZD1839 is Generally Well-Tolerated and Has Activity in Non-Small-Cell Lung Cancer and Other Solid Tumors: Results of a Phase I Trials”, *Journal of Clinical Oncology*, vol. 20, n° 18. pp. 3815-3825, 2002
- ⁶⁰ M. Ranson et al, “ZD1839, a Selective Oral Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, is Well Tolerated and Active in Patients With Solid, Malignant Tumors: : Results of a Phase I Trials”, *Journal of Clinical Oncology*, vol. 20, n° 9, pp. 2240-2250, 2002
- ⁶¹ Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dediu M, Findlay B, Tu D, Johnston D, Bezjak A, Clark G, Santabarbara P, Seymour L. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353:123-132
- ⁶² Gridelli C, Rossi A, Maione P. Treatment of non-small cell lung cancer and targeted therapies: where are we? *Curr Opin Oncol* 2005; 17:114-117

⁶³ Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497-500

⁶⁴ Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying re- sponsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129-39

⁶⁵ Luetteke NC, Lee DC (1990). Transforming growth factor alpha: expression, regulation and biological action of its integral membrane precursor. *Semin. Cancer Biol.* 1 (4): 265–75. PMID 2103501

⁶⁶ Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, Greene MI (agosto 2007). ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J. Clin. Invest.* 117 (8): 2051–8. DOI:10.1172/JCI32278. PMID 17671639.

⁶⁷ Olayioye MA (2001). Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* 3 (6): 385–389. DOI:10.1186/bcr327. PMID 11737890

⁶⁸ J. Downward et al, “Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor”, *Nature*, vol. 311, pp. 483-485, 1984

⁶⁹ K. Oda et al, “A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling”, *Mol. Syst. Biol*, vol.1, pp. 1-17, 2005

⁷⁰ PJ. Coffey et al, “Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation”, *Biochem. J*, vol. 335, pp. 1-13, 1998

⁷¹ W. X. Schulze et al, “Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family”, *Mol. Syst. Biol*, vol.1, pp. 1-13, 2005

-
- ⁷² N. Zarich et al, "Grb2 Is a Negative Modulator of the Intrinsic Ras-GEF Activity of hSos1", *Molecular Biology of the Cell*, vol. 17, pp. 3591-3597, 2006
- ⁷³ J. Avruch et al, "Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade", *Recent. Prog. Horm. Res*, vol. 56, pp. 127-155, 2001
- ⁷⁴ Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22 (2): 153–83. DOI:10.1210/er.22.2.153. PMID 11294822.
- ⁷⁵ D. S. Salomon et al, "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies", *Critical Reviews in Oncology/Ematology*, vol. 19, pp. 183-232, 1995
- ⁷⁶ R. Pérez-Soler, "HER1/EGFR targeting: refining the strategy", *Oncologist*, vol. 1, pp. 58-67, 2004
- ⁷⁷ Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304(5676):1458-1461
- ⁷⁸ Riely GJ, Pao W, Pham D, Li AR, Rizvi N, Venkatraman ES, Zakowski MF, Kris MG, Ladanyi M, Miller VA. Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res* 2006; 12(3 Pt 1):839-844
- ⁷⁹ A. Sakurada et al, "Predictive biomarkers for EGFR therapy", *IDrugs*, vol. 12, n° 1, pp. 34-38, 2009
- ⁸⁰ V. A. Miller et al, "Molecular Characteristics of Bronchioloalveolar Carcinoma and Adenocarcinoma, Bronchioloalveolar Carcinoma Subtype, Predict Response to Erlotinib", *Journal of Clinical Oncology*, vol. 26, n° 9, pp. 1472-1478, 2008

-
- ⁸¹ T. J. Lynch et al, “Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib”, *The New England Journal of Medicine*, vol. 350, n° 21, pp. 2129-2139, 2004
- ⁸² H. Uramoto et al, “Which biomarker predicts benefit from EGFR-TKI treatments for patients with lung cancer?”, *British Journal of Cancer*, vol. 96, pp. 857-863, 2007
- ⁸³ Yu J, Kane S, Wu J, Benedettini E, Li D, Reeves C, et al. Mutation-specific antibodies for the detection of EGFR mutations in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15(9):3023–8.
- ⁸⁴ Brevet M, Arcila M, Ladanyi M. Assessment of EGFR mutation status in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry using antibodies specific to the two major forms of mutant EGFR. *J Mol Diagn* 2010;12(2):169–76.
- ⁸⁵ Kitamura A, Hosoda W, Sasaki E, Mitsudomi T, Yatabe Y. Immunohistochemical detection of EGFR mutation using mutation-specific antibodies in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16(13):3349–55.
- ⁸⁶ J Wheler et al., “Revisiting Clinical Trials Using EGFR Inhibitor-Based Regimens in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Retrospective Analysis of an MD Anderson Cancer Center Phase I Population”; *Oncotarget* 2013; 4: 772-784
- ⁸⁷ Antonio Marchetti, EGFR Mutations in Non–Small-Cell Lung Cancer: Analysis of a Large Series of Cases and Development of a Rapid and Sensitive Method for Diagnostic Screening With Potential Implications on Pharmacologic Treatment; *J Clin Oncol* 2005; 23:857-865.
- ⁸⁸ H Ju Lee et al., “Comparison of Direct Sequencing, PNA Clamping-Real Time Polymerase Chain Reaction, and Pyrosequencing Methods for the Detection of EGFR Mutations in Non-small Cell Lung Carcinoma and the Correlation with Clinical Responses to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment”; *The Korean Journal of Pathology* 2013; 47: 52-60

⁸⁹ S Dufort et al., “Pyrosequencing, a method approved to detect the two major EGFR mutations for anti EGFR therapy in NSCLC”; Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2011, 30:57

⁸⁶ Lindeman et al., “molecular Testing Guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and Alk Tyrosine Kinase Inhibitors.