

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

Scuola di Medicina e Chirurgia.



## DOTTORATO DI RICERCA IN MORFOLOGIA CLINICA E PATOLOGICA

Coordinatore: Prof. Stefania Montagnani

**La rilevazione dello stato mutazionale di EGFR su campione citologico di neoplasia polmonare a cellule non piccole: il ruolo dell' anatomo patologo nella validazione analitica e clinica.**

**Relatore**

**Ch. mo**

**Prof. Giancarlo Troncone**

**Candidato**

**Dott.**

**Claudio Bellevicine**

**Anno Accademico 2014/2015**

# INDICE

<b>I. SOMMARIO</b>	<i>pag. 1</i>
<b>II. INTRODUZIONE</b>	<i>pag. 3</i>
<b>III. SCOPO DELLA TESI</b>	<i>pag. 5</i>
<b>IV. MATERIALI E METODI</b>	<i>pag. 6</i>
IV. 1 <i>Processazione Pre Analitica</i>	<i>pag. 7</i>
IV. 2 <i>Validazione dei saggi per la rilevazione           delle mutazioni negli esoni 19 e 21 di EGFR</i>	<i>pag. 8</i>
IV. 3 <i>Analisi delle mutazioni di EGFR negli esoni 19 e 21</i>	<i>pag. 9</i>
IV.4 <i>Valutazione della risposta clinica</i>	<i>pag.10</i>
<b>V. RISULTATI</b>	<i>pag. 11</i>
V. 1 <i>Tasso di mutazione di EGFR</i>	<i>pag. 11</i>
V. 2 <i>Risposta clinica</i>	<i>pag. 12</i>
<b>VI. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE</b>	<i>pag. 13</i>
<b>VII. REFERENZE</b>	<i>pag. 15</i>



## **SOMMARIO**

### **INTRODUZIONE**

La terapia mirata del carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC) con inibitori del dominio tirosin-chinasico (anti-TKI) del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) è efficace solo nei pazienti con mutazioni di tale gene. Le mutazioni più frequenti sono rappresentate da delezioni nell'esone 19 e dalla mutazione puntiforme (L858R) nell'esone 21. A causa della scoperta in fase avanzata di tali neoplasie, spesso la diagnosi di carcinoma polmonare è esclusivamente citologica; il DNA estratto dai campioni citologici viene poi utilizzato per determinare lo stato mutazionale di EGFR. Tuttavia, la possibilità che le mutazioni siano distribuite nel tessuto polmonare eterogeneamente è tutt'ora discussa. E' possibile che i campioni citologici non siano del tutto rappresentativi dello stato mutazionale dell'intera neoplasia e quindi, il valore predittivo dell'analisi mutazionale effettuata esclusivamente su citologico è ancora dubbia. Questa Tesi Sperimentale esamina il ruolo del patologo nella gestione del materiale citologico da NSCLC, dalla valutazione pre-analitica del vetrino, alla supervisione delle fasi analitiche dei test molecolari e, infine, alla sintesi finale nel report diagnostico. È stata inoltre studiata la validità del campione citologico come substrato biologico adeguato nella predizione della risposta alla terapia anti-TKI.

### **METODI**

Dal luglio 2010 al luglio 2012 il Laboratorio di Citologia del Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali dell'Università Federico II di Napoli, ha ricevuto 364 campioni citologici e 318 campioni istologici. Il criterio di adeguatezza per l'esame molecolare era la presenza di almeno 25 cellule neoplastiche. L'analisi mutazionale era condotta con un saggio di analisi della lunghezza dei frammenti per le delezioni dell'esone 19 e con la metodica TaqMan per la L858R dell'esone 21. Le mutazioni erano confermate mediante sequenziamento diretto; i casi discordanti sono stati valutati tramite clonaggio genico. I dati di risposta al trattamento (RR) con gefinitib e di progressione libera da malattia (PFS) ottenuti durante un follow-up mediano di 12 mesi (range 3-34) erano valutabili in 26 pazienti, selezionati per il trattamento grazie ad una diagnosi di mutazione fatta su istologico (n=13) o su citologico (n=13).

## **RISULTATI**

La percentuale di casi mutati su campione istologico (8.5%) era simile a quella dei campioni citologici (8.8%). Allo stesso modo il dati di RR (54%) e di PFS (9.2 mesi) dei pazienti selezionati su istologia erano simili (RR = 62%, PFS = 8.6 mesi) a quelli selezionati su citologia (p = 0.88). La percentuale di controllo della malattia (casi responsivi più stabili) era del 92% in pazienti selezionati su istologia e del 100% in pazienti selezionati su citologia.

## **CONCLUSIONI**

Da questa Tesi Sperimentale emerge il ruolo essenziale del patologo nella valutazione delle problematiche pre-analitiche e analitiche nella valutazione del campione citologico per l'analisi molecolare e indica che le mutazioni di EGFR identificate su tale campione sono in grado di predire il trattamento con TKI con lo stesso grado di affidabilità di quelle riscontrate su campioni istologici.

## II- INTRODUZIONE

La determinazione dello stato mutazionale del recettore del fattore di crescita epiteliale (EGFR) rappresenta un elemento importante ai fini della scelta terapeutica per i pazienti affetti da carcinoma del polmone a cellule non piccole (NSCLC). Tale valutazione consente nei pazienti con NSCLC in stadio avanzato l'impiego, come mono-terapia in prima linea, degli inibitori tirosino-chinasici (TKI) di EGFR gefitinib ed erlotinib. (1) Tuttavia tale possibilità terapeutica è limitata a quei pazienti contraddistinti da alterazioni strutturali del gene codificante per EGFR; tali anomalie di sequenza genica sono prevalentemente associate agli esoni 19 (delezioni in frame) e 21 (mutazione puntiforme L858R). Queste alterazioni sono più frequenti nel sesso femminile, nell'istotipo adenocarcinoma, nei pazienti asiatici ed in quelli non fumatori. (2) I pazienti con mutazione di EGFR grazie al trattamento con TKI hanno una migliore qualità di vita, una elevata percentuale di risposta al trattamento (RR) ed una progressione libera da neoplasia (PFS) prolungata. Come dimostrato nel clinical trial IPASS i pazienti non portatori di mutazioni nel gene dell'EGFR possono essere trattati unicamente con la chemioterapia, (3) infatti la somministrazione del farmaco biologico in assenza di mutazioni comporta ulteriore danno alle condizioni di salute del paziente (effetto detrimentalmente).

La determinazione dello stato di EGRF è generalmente effettuata su campione biotico ottenuto dalla neoplasia primitiva, in alcuni casi tale valutazione è eseguita anche sulla metastasi corrispondente. Spesso il tumore è diagnosticato in uno stadio avanzato (IIIB- IV) nel quale l'approccio chirurgico è sconsigliato; per tale motivo la piccola biopsia endoscopica o trans-toracica e/o il campione citologico rappresentano, in molti casi, gli unici campioni a disponibili.(1) Gli studi clinici di validazione che hanno portato alla approvazione da parte del FDA e dell' EMEA della terapia target con TKI hanno arruolato i pazienti testando EGFR esclusivamente su campioni istologici di NSCLC. (3, 4) Al contrario, il campione citologico non è stato utilizzato nei trials clinici. Tuttavia, la necessità clinica di valorizzare il campione citologico ha spinto numerosi gruppi a svolgere ricerche finalizzate alla validazione

del campione citologico come materiale biologico adeguato per l'analisi delle mutazioni genetiche di bersagli molecolari. (1) I primi studi su campione citologico hanno utilizzato campioni prelevati specificamente per il test molecolare. (5-9) In particolare, un secondo prelievo, in aggiunta a quello per la microscopia, veniva sospeso in un buffer dedicato all'estrazione del DNA. (5-9) Studi successivi hanno testato EGFR su campioni citologici e paragonato il risultato a quello ottenuto su campione istologico corrispondente prelevato dagli stessi pazienti di cui era disponibile la citologia. (10-13) Tale approccio ha mostrato sui citologici risultati quasi sempre concordanti con quelli ottenuti su istologico. Sulla scorta di tali studi metodologici, più di recente diverse Istituzioni hanno riportato la loro esperienza su campioni citologici di routine. (14-17) I risultati ottenuti sono stati altamente positivi; come atteso, le mutazioni sono state prevalentemente riscontrate sui campioni citologici ottenuti da donne, non fumatrici e istotipo adenocarcinoma, con una frequenza (10%) di mutazione riscontrata usualmente nella popolazione caucasica. (14-17) Questi risultati sono stati ottenuti indipendentemente dal tipo di campione (esfoliativo/aspirativo) e dal tipo di preparazione (striscio diretto/cell block).

Tuttavia, la scarsità di materiale che spesso caratterizza il campione citologico può limitarne l'impiego. Un ulteriore problema è rappresentato dalle implicazioni medico-legali legate al "sacrificio" di un vetrino allestito contenente le cellule neoplastiche sulla cui osservazione microscopica si è basata la diagnosi; poiché non vi sono, al momento, delle indicazioni chiare circa l'utilizzo dei campioni di archivio, spesso i vetrini selezionati dal patologo "primario", che ha effettuato la diagnosi cito-istopatologica, ed inviati ad un centro di riferimento per l'analisi molecolare, sono spesso non ottimali e rappresentativi della lesione. Infatti nei laboratori dove l'analisi di EGFR è centralizzata il tasso di inadeguati è basso ma non trascurabile (10%), come mostrato da Pang *et al.* (16) L'implementazione di metodiche più sensibili, quali la real-time PCR (RT-PCR), è in grado di ridurre significativamente il tasso di campioni ritenuti inadeguati. In maniera analoga, nell'esperienza pubblicata da Allegrini *et al.* (17) nonostante l'impiego di una metodologia estremamente sensibile, (Scorpion-ARMS; TheraScreen EGFR29 kit) il tasso di inadeguati era pari al 14%. Questi dati confermano che l'esternalizzazione del test EGFR richiede una stretta interazione tra l'esame microscopico e quello molecolare. Questa Tesi Sperimentale esamina il ruolo del patologo nella valutazione molecolare dello stato mutazionale di EGFR, dalla valutazione pre-analitica del vetrino, alla supervisione delle fasi analitiche dei test molecolari e, infine, alla

sintesi finale nel report diagnostico. Inoltre, viene verificata l'attendibilità del risultato dell'analisi dello stato mutazionale di EGFR condotta su pazienti per cui era disponibile esclusivamente il campione citologico confrontandola con quella di pazienti in cui, al contrario, era disponibile il campione istologico, comparando parametri clinici come la PFS ed il RR.

### **III- SCOPO DELLA TESI**

Al di là delle considerazioni tecniche la possibilità di utilizzare il campione citologico deve tenere in considerazione anche problematiche di ordine biologico. In particolare, in considerazione di una possibile eterogenea distribuzione delle cellule mutate, è possibile che lo stato mutazionale di EGFR valutato sul campione citologico non sia rappresentativo di quello dell'intera popolazione neoplastica. Quindi se è possibile individuare la mutazione di EGFR utilizzando solo poche cellule è ipotizzabile che le mutazioni riscontrate nel campione citologico non siano rappresentative dell'intera popolazione neoplastica. A tale scopo è fondamentale correlare il risultato del test mutazionale ottenuto in citologia non solo alle caratteristiche del paziente (sesso, abitudine al fumo ed istologia) come già fatto in passato ma anche e soprattutto ai dati di risposta al trattamento. Per questo motivo questa Tesi valuta il dato di RR e quello di PFS in un gruppo di pazienti selezionati tramite test molecolare su campione citologico e lo correla ai dati ottenuti da un gruppo distinto di pazienti selezionati su biopsia istologica. Lo scopo ultimo di questa Tesi è quello di fornire ai pazienti, agli oncologi ed ai patologi primari dati inerenti il grado di affidabilità della predizione di risposta al trattamento fornito dall'esame mutazionale di EGFR svolto su campione citologico.

## IV- MATERIALI E METODI

Il laboratorio di citologia del Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali dell'Università Federico II di Napoli è il maggiore centro di riferimento per i test EGFR dell'Italia meridionale. (18-20) Il laboratorio svolge regolarmente su base annuale controlli esterni di qualità organizzati sia della European Society of Pathology che della Società Italiana di Anatomia Patologica e di Citopatologia (SIAPEC), con risultati accurati e riproducibili (genotipizzazione corretta pari al 100% dei casi controllo esaminati).

Nel periodo compreso tra il Luglio 2010 ed il Luglio 2012 il laboratorio ha testato le mutazioni di EGFR su 682 campioni di NSCLC di pazienti in stadio III-IV, di età compresa tra i 29 e gli 86 anni (media anni 56). I dati personali e clinici relativi ad ogni paziente sono stati ottenuti tramite la piattaforma web [www.egfrfastnet.it](http://www.egfrfastnet.it) (curata dalla SIAPEC e dall'Associazione Italiana di Oncologia Medica), che mette in comunicazione telematica le varie professionalità (oncologi, patologi e biologi molecolari) con le strutture operanti in tutta Italia per lo svolgimento dei test mutazionali su EGFR. I campioni dei pazienti, pervenuti presso il nostro laboratorio, sono stati inviati da tredici differenti istituzioni, dislocate in varie regioni italiane. Tra i documenti ricevuti (oltre al consenso informato) era richiesto il referto originale del paziente comprensivo della descrizione microscopia e della eventuale immunocitochimica effettuata. Tali dati sono stati tabulati dopo revisione e standardizzazione in accordo con i criteri della International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. (21) Le diagnosi di adenocarcinoma e carcinoma squamocellulare sono effettuate applicando criteri esclusivamente morfologici. Qualora, nei carcinomi poco differenziati vengono utilizzate colorazioni immunocitochimiche ancillari, si ha una diagnosi che favorisce l' adenocarcinoma o il carcinoma squamocellulare a seconda del profilo immunocitochimica espresso (TTF1+, CK7+, napsina +, p63-, CK5/6- per l' adenocarcinoma; p63+, CK5/6+, TTF1-, CK7-, napsina – per lo squamoso). I casi in cui le colorazioni ancillari non siano state contributive o non sono state effettuate a causa della scarsità del materiale sono classificati come carcinomi a cellule non piccole non altrimenti specificati. (NSCLC-NOS).

E' stato analizzato un numero comparabile di campioni citologici (n=364) ed istologici (n=318) (53% vs 47%) (Tabella 1). I campioni istologici erano costituiti da 52 resezioni chirurgiche e 266 piccole biopsie; i campioni citologici aspirativi (FNA) comprendevano 305

ago-aspirati di cui 271 TC-guidati, 31 aspirati transbronchiali (TBNA) e 3 aspirati da masse palpabili. I campioni di citologia esfoliativa (n=59) comprendevano 30 versamenti pleurici, 27 washing e brushing bronchiali, e 2 espettorati. I campioni citologici prelevati dal tumore primitivo sono stati 292 mentre dalle metastasi 72 (Tabella 2).

#### ***IV.1 Processazione Pre-analitica.***

Ogni caso inviato al nostro centro viene revisionato dall' anatomo-patologo che ne valuta l'adeguatezza sulla base del numero di cellule neoplastiche osservate e del rapporto relativo fra componente neoplastica e contaminanti non neoplastici (es. istiociti alveolari, cellule infiammatorie ecc.). Se la percentuale di cellule neoplastiche del campione è superiore al 20%, il vetrino è ritenuto idoneo per l'analisi mutazionale (limite inferiore di sensibilità analitica del metodo di sequenziamento diretto secondo Sanger). Se il numero di cellule neoplastiche è inferiore al 20% ma superiore a 25 cellule (numero sufficiente per individuare una specifica mutazione con tecniche più sensibili) il campione viene sottoposto alla microdissezione laser (laser capture microdissection, LCM). Questa metodica permette di prelevare dal vetrino le cellule neoplastiche contemporaneamente alla loro visualizzazione microscopica, effettuando quindi la successiva analisi genetica in modo mirato.

La processazione dei campioni istologici prevede: colorazione in ematossilina/eosina (E/E) di una sezione da 5 micron destinata alla valutazione della cellularità neoplastica, 4 sezioni (campioni chirurgici) e 5 sezioni (piccole biopsie) da 20 micron per la microdissezione manuale dell' area selezionata su E/E mediante un bisturi sterile, con raccolta del materiale nel tubino da 1.5 ml. Nel caso di campioni citologici con cellularità neoplastica >20%, il vetrino viene fotografato al fotomicroscopio (LEICA DMD108, Milano, Italia) per preservare su file digitale l' immagine microscopica. Successivamente è avviata la processazione vera e propria che inizia con lo "smontaggio" del vetrino coprioggetto mediante incubazione in xilene in una provetta Falcon da 50ml. Dopo l' allontanamento del coprioggetto viene effettuata la raccolta del materiale dall' intero vetrino. Come riportato sopra, qualora il campione presentasse una percentuale di cellule tumorali <20 %,

quest'ultimo è sottoposto ad arricchimento cellulare tramite il seguente approccio. Se l'area con la massima concentrazione cellulare è superiore ai 2mm di diametro, questa viene selezionata con punta di diamante su vetrino e si effettua la raccolta delle componenti cellulari delimitate da tale area. Se l'area è inferiore ai 2 mm di diametro si ricorre alla microdissezione laser LCM, e il materiale microdissezionato viene "catapultato" dall'impulso del laser direttamente nel tappo del tubino. Dal punto di vista biologico il campione è adeguato se l'esito del test identifica eventuali mutazioni nell'esone 19 o nell'esone 21, oppure se entrambi i geni risultano wild type. E' inadeguata l'analisi molecolare quando gli esoni 19 e 21 non vengono amplificati oppure se viene amplificato uno solo dei 2 esoni e l'esito risulta wild type.

#### ***IV.2 Validazione dei saggi per la rilevazione delle mutazioni negli esoni 19 e 21 di EGFR:***

In una fase preliminare a quella della implementazione clinica, la metodica molecolare, sviluppata per il rilevamento delle mutazioni, è stata validata attraverso l'impiego di tre linee cellulari: PC9 (caratterizzate dalla delezione nell'esone 19 GLU746-ALA750), HI975 (caratterizzate dalla mutazione puntiforme L858R) e A549 (Wild Type.) La linea cellulare delle PC9 è stata ottenuta dal CNR/IEOS Institute (Napoli, Italia.) Per osservare il limite minimo di allele valutabile abbiamo effettuato delle diluizioni seriali tra le linee cellulari mutate e quella wild type nelle proporzioni del 50%, 30%, 20%, 10%, 5%. Come mostrato in figura 1 il limite minimo di rilevazione per le mutazioni dell'esone 19 e dell'esone 21 era rispettivamente del 10% e del 5%. Pertanto un campione con il 20% di cellule tumorali ha bisogno di raggiungere almeno il 10% di allele mutato nell'esone 19 come limite minimo per l'analisi, assumendo che la mutazione sia in eterozigosi. Per testare il minimo numero di cellule neoplastiche per la rilevazione delle mutazioni abbiamo dissezionato 5, 25, 50, 100 cellule delle linee PC9 e HI975 da vetrini allestiti e colorati con Papanicolaou. I risultati hanno confermato che la presenza di almeno 25 cellule attribuisce significatività all'analisi. (figura2).

### ***IV. 3 Analisi Delle Mutazioni Di EGFR Negli Esoni 19 E 21***

L'estrazione del DNA genomico avviene attraverso l'utilizzo del QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Crawley, West Sussex, UK). Il DNA è stato poi sospeso in 20 µl di acqua nanofiltrata (NOT DEPC). La determinazione della quantità di DNA è stata realizzata mediante utilizzo del NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Milan, Italy). L'analisi delle mutazioni che ricadono nell'esone 19 è stata effettuata tramite il saggio di analisi dei frammenti che discrimina le delezioni in frame più frequenti nell'esone 19 mentre la mutazione puntiforme L858R dell'esone 21 è stata visualizzata attraverso saggio Taqman. Le coppie di primers, le sonde, le condizioni di esecuzione delle reazioni di amplificazione e i criteri di interpretazione dei risultati si rifanno a quelle descritte da Molina *et al.* (9) I prodotti di amplificazione per la conferma della mutazione nell'esone 21 oppure per la tipizzazione della delezione del 19 sono poi sequenziati con metodo di Sanger. Nei casi discordanti, i prodotti di amplificazione sono stati clonati in vettori TOPO TA (Invitrogen, CA), ogni campione risultava clonato in 30 plasmidi che sono stati purificati e sequenziati mediante l'impiego del BigDye Terminator Kit v.3.1 (Applied Biosystems) per poi essere analizzati da ABI 3730 analyser (Applied Biosystems) con un primer forward e reverse M13. L'analisi del risultato si è avvalsa del Mutation Surveyor (SoftGenetics). La positività del campione per la mutazione di EGFR ha richiesto il riscontro della mutazione almeno in un plasmide. (22)

#### ***IV.4 Valutazione Della Risposta Clinica***

I soggetti sottoposti alle terapie con TKI sono stati inclusi nel presente studio se rispondenti ai seguenti criteri:

- 1) conferma delle mutazioni di EGFR nell'esone 19 o nell'esone 21,
- 2) somministrazione di gefitinib per il trattamento della neoplasia,
- 3) minimo 3 mesi di follow-up clinico-strumentale.

Tali criteri risultano pienamente soddisfatti in 26 pazienti (maschi =15, femmine=11, età media =54), la cui mediana di follow-up era di 12 mesi (in un range compreso dai 3 ai 34 mesi). L'evoluzione della neoplasia è stata valutata per ogni paziente attraverso una TAC total body e i benefici derivanti dal trattamento con i TKI per i pazienti selezionati in base alle mutazioni del gene EGFR sono stati comparati tra campioni citologici e istologici. I criteri oggettivi di valutazione della risposta (regression rate RR) sono il Response Evaluation Criteria per i tumori solidi (RECIST). (23) Il tempo libero da progressione della malattia (progression free survival, PFS) è stato calcolato a partire dalla data di inizio del trattamento con Gefitinib e copre l'intervallo di tempo che intercorre tra tale data e la progressione o la morte del paziente indipendentemente dalla causa. I dati di PFS sono riportati nel grafico (figura 4) secondo le curve di Kaplan-Meier. Un valore di  $p < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate con il software dell'IBM SPSS statistics 18 (SPSS.Inc , Chicago, IL).

## V- RISULTATI

### *V.1 Tasso Di Mutazione Di EGFR*

La maggior parte dei campioni (599/682, 87,8%) sono risultati adeguati per l'analisi molecolare; di questi, 294 sono campioni istologici e 305 citologici. La percentuale di esclusione è del 7,5% (24/318) per i campioni istologici e del 16,2 (59/364) per quelli citologici. I 59 campioni citologici respinti sono riportati in tabella 3. In un unico caso di campione biotico (istologico) l'amplificazione è fallita.

I campioni mutati per EGFR sono risultati 52 (8,7% dei casi, 34 delezioni del 19 e 18 mutazioni puntiformi L858R) e in 2 casi, la delezione del 19 osservata mediante analisi dei frammenti non è stata confermata al sequenziamento diretto, che invece evidenziava una sequenza wild type. Come riportato in tabella 3, le mutazioni sono più frequenti nelle donne (35/599, 62%  $p=0,0001$ ), nei non fumatori (42/599 80,7%  $p=0,03$ ), sono inoltre associate all'istotipo dell'ADC (48/599 92,3%  $p=0,007$ ) sia identificato con criteri unicamente morfologici (42/52 80,7%) che mediante colorazioni immunocitochimiche (6/52 11,5%). Tre casi mutati (5,7%) erano classificati come NSCLC-NOS mentre un unico caso di SCC è risultato mutato (1,9%).

## ***V.2 Risposta Clinica***

I dati relativi al trattamento col gefitinib sono stati registrati per i 26 pazienti che rispondevano ai criteri di inclusione, con somministrazione di gefitinib in prima linea (n=18 pazienti) in seconda linea (n=2) e in quarta linea (n=6). 15 pazienti hanno sviluppato una risposta parziale al trattamento con gefitinib (PR), compresi anche i 2 pazienti risultati mutati all'analisi dei frammenti e wild type al sequenziamento diretto (figura 3), senza differenze statisticamente significative tra i campioni citologici e istologici (Tabella 4). La stabilità della patologia (SD) è stata accertata in 9/26 pazienti; al contrario, un unico paziente valutato su campione istologico ha sviluppato la progressione della malattia (PD). Il rate di controllo della malattia (PR+SD) è stato stimato attorno al 96% (25/26 pazienti) (Figura 4).

## VI- CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Questo studio ha confermato che le mutazioni di EGFR determinate su campioni citologici dal nostro laboratorio, sono predittive della risposta alla terapia con TKI al pari delle mutazioni riscontrate sui campioni istologici.

Il ruolo del patologo nel test di EGFR su piccoli campioni quali i campioni citologici è essenziale. La rivalutazione morfologica del campione rappresenta una fase preliminare imprescindibile, in cui è il patologo a determinare la fattibilità del test (adeguatezza) e le modalità con cui questo sarà eseguito. È infatti in base al tipo di cellularità assoluta e relativa (rapporto cellule neoplastiche/contaminanti non neoplastici) che viene decisa la modalità di micro dissezione (manuale vs laser). Inoltre la supervisione di tutte le fasi analitiche del processo da parte del patologo permette una valutazione critica del dato molecolare grazie al confronto con il tipo di campione, la sua morfologia e le informazioni cliniche, evidenziando i gli eventuali problemi tecnici ed evitando così la refertazione di risultati fallati da inefficienze della metodica. Per questo, è fondamentale la collaborazione delle differenti professionalità implicate nel processo, dal tecnico di laboratorio al biotecnologo medico che, insieme al patologo responsabile, costituiscono il team multidisciplinare minimo per una corretta gestione del laboratorio di biologia molecolare in Anatomia Patologica.

Il problema principale che ha scoraggiato in passato l'impiego dei campioni citologici per lo studio delle mutazioni di EGFR era legato alla scarsa rappresentatività della cellularità neoplastica. (24, 25) Oggi invece sappiamo, attraverso la nostra esperienza e quella di differenti gruppi di studio, (1, 18, 19, 20) che un minimo 25 cellule neoplastiche ottenute mediante microdissezione del campione è adeguato per l'analisi molecolare. Tale dato è stato anche riportato da Savic *et al* (26), Molina *et al* (9) e più recentemente da Chowdhuri *et*

*al* (10). Poter utilizzare un numero così limitato di cellule neoplastiche, permette di abbattere il numero di campioni classificati come inadeguati. Infatti, la percentuale di campioni non adeguati per i test molecolari è ancora elevata. Secondo lo studio condotto da Pang *et al.* (16) la percentuale di inadeguati si aggira attorno al 10%. La nostra esperienza, che si basa sull'utilizzo di un singolo vetrino inviato da patologi di altre Istituzioni, ha stimato una percentuale di campioni inadeguati che si aggira attorno al 16%. Uno degli requisiti necessari per ridimensionare il numero di inadeguati, prevede una fattiva collaborazione del patologo primario affinché invii al centro di riferimento materiale adeguato e rappresentativo della lesione. La nostra esperienza dimostra che testando solo 25 cellule neoplastiche è possibile individuare la mutazione di EGFR e che tale dato ha un forte riscontro clinico con una positiva risposta al trattamento.

Infatti, il significato predittivo della mutazione rilevata su campione citologico è stato valutato comparando la risposta clinica di pazienti in cui era stato analizzato il campione citologico con quelli analizzati su campione istologico. L'RR osservato nei pazienti selezionati su citologia è del 62 % e il PFS di 8,6 mesi. I risultati dei pazienti selezionati mediante istologia risultano simili (RR=54% PFS= 9,2 mesi). L'unico paziente andato in progressione è stato selezionato da campione istologico. Similmente a quanto da noi riportato, Lozano *et al* hanno identificato un RR del 75% e una mediana di PFS di 12,3 mesi in 16 pazienti trattati con erlotinib e gefitinib. (12)

La distribuzione delle mutazioni di EGFR nei carcinomi polmonari a cellule non piccole è ancora controversa. (25) Alcuni studi ipotizzano che la distribuzione delle mutazioni sia eterogenea nella popolazione tumorale e questo implica che il campione citologico, sotto questo aspetto, possa essere non rappresentativo dell'intera componente neoplastica. Tale fenomeno è stato recentemente indagato da Yatabe *et al.*, (27) che ha mostrato l'estrema rarità di tale fenomeno, teorizzando una "pseudo eterogeneità" legata all'amplificazione selettiva del gene dell'allele mutato (MASI). Infatti, le cellule tumorali mutate andrebbero incontro ad amplificazione del gene EGFR dell'allele mutato durante la progressione della neoplasia. Considerando la sostanziale omogeneità di distribuzione della mutazione nel carcinoma del polmone, il campione citologico è efficace quanto l'istologico nella predizione della risposta al trattamento con gefitinib. Inoltre, abbiamo osservato come anche piccole quantità di allele mutato rilevate con tecniche più sensibili come l'analisi dei frammenti, siano predittive di risposta alla terapia. (28, 29)

Questo fenomeno, osservato in questo lavoro in 2 casi, fa supporre che l'impiego di metodiche più sensibili per la rilevazione della mutazioni anche in campioni con scarsa cellularità ha un importante impatto clinico. In conclusione, i risultati ottenuti hanno confermato l'adeguatezza dei campioni citologici nella determinazione dello stato mutazionale di EGFR e l'efficacia di tale determinazione nella predizione dell'impiego di farmaci biologici nei pazienti affetti da carcinoma a cellule non piccole del polmone.

## VII- REFERENZE

1. da Cunha Santos G, Saieg MA, Geddie W, Leighl N. EGFR gene status in cytological samples of nonsmall cell lung carcinoma: Controversies and opportunities. *Cancer Cytopathol* 2011;119(2):80-91.
2. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358(11):1160-74.
3. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361(10):947-57.
4. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, Zhu CQ, Kamel-Reid S, Squire J et al, Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med*. 2005 Jul 14;353(2):133-44
5. Horiike A, Kimura H, Nishio K, Ohyanagi F, Satoh Y, Okumura S, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutation in transbronchial needle aspirates of non-small cell lung cancer. *Chest* 2007;131(6):1628-34.
6. Lim EH, Zhang SL, Yu K, Nga ME, Ahmed DA, Agasthian T, et al. An alternative approach to determining therapeutic choices in advanced non-small cell lung carcinoma (NSCLC): maximizing the diagnostic procedure and the use of low-volume lung biopsies. *J Thorac Oncol* 2007;2(5):387-96.
7. Asano H, Toyooka S, Tokumo M, Ichimura K, Aoe K, Ito S, et al. Detection of EGFR gene mutation in lung cancer by mutant-enriched polymerase chain reaction assay. *Clin Cancer Res* 2006;12(1):43-8.
8. Fassina A, Cappellesso R, Simonato F, Lanza C, Marzari A, Fassan M. Fine needle aspiration of non-small cell lung cancer: Current state and future perspective. *Cytopathology* 2012 ;23(4):213-19.
9. Molina-Vila MA, Bertran-Alamillo J, Reguart N, Taron M, Castella E, Llatjos M, et al. A sensitive method for detecting EGFR mutations in non-small cell lung cancer samples with few tumor cells. *J Thorac Oncol* 2008;3(11):1224-35.
10. Chowdhuri SR, Xi L, Pham TH, Hanson J, Rodriguez-Canales J, Berman A, et al. EGFR and KRAS mutation analysis in cytologic samples of lung adenocarcinoma enabled by laser capture microdissection. *Mod Pathol*.2012
11. Fukui T, Ohe Y, Tsuta K, Furuta K, Sakamoto H, Takano T, et al. Prospective study of the accuracy of EGFR mutational analysis by high-resolution melting analysis in small samples obtained from patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(15):4751-7.
12. Lozano MD, Zulueta JJ, Echeveste JI, Gurrupide A, Seijo LM, Martin-Algarra S, et al. Assessment of epidermal growth factor receptor and K-ras mutation status in cytological stained smears of non-small cell lung cancer patients: correlation with clinical outcomes. *Oncologist* 2011 ;16(6):877-85.
13. Betz BL, Roh MH, Weigelin HC, Placido JB, Schmidt LA, Farmen S, et al. The application of molecular diagnostic studies interrogating EGFR and KRAS mutations to stained cytologic smears of lung carcinoma. *Am J Clin Pathol*2011 ;136(4):564-71.
14. Aisner DL, Deshpande C, Baloch Z, Watt CD, Litzky LA, Malhotra B, et al. Evaluation of EGFR mutation status in cytology specimens: An institutional experience. *Diagn Cytopathol*.2011
15. Billah S, Stewart J, Staerckel G, Chen S, Gong Y, Guo M. EGFR and KRAS mutations in lung carcinoma: molecular testing by using cytology specimens. *Cancer Cytopathol*;119(2):111-7.
16. Pang B, Matthias D, Ong CW, Dhewar AN, Gupta S, Lim GL, et al. The positive impact of cytological specimens for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: a single South East Asian laboratory's analysis of 670 cases. *Cytopathology*2012;23(4):229-36.
17. Allegrini S, Antona J, Mezzapelle R, Miglio U, Paganotti A, Veggiani C, et al. Epidermal growth factor receptor gene analysis with a highly sensitive molecular assay in routine cytologic specimens of lung adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol*2012;138(3):377-81.
18. Malapelle U, Bellevicine C, Zeppa P, Palombini L, Troncone G. Cytology-based gene mutation tests to predict response to anti-epidermal growth factor receptor therapy: A review. *Diagn Cytopathol*.2011

19. Malapelle U, de Rosa N, Rocco D, Bellevicine C, Crispino C, Illiano A, et al. EGFR and KRAS mutations detection on lung cancer liquid-based cytology: a pilot study. *J Clin Pathol*.2012
20. Malapelle U, de Rosa N, Bellevicine C, Rocco D, Vitiello F, Piantedosi FV, et al. EGFR mutations detection on liquid-based cytology: is microscopy still necessary? *J Clin Pathol*2012;65(6):561-4.
21. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*2011;6(2):244-85.
22. Malapelle U, Carlomagno C, Salatiello M, De Stefano A, De Luca C, Bianco R, et al. KRAS mutation detection by high-resolution melting analysis significantly predicts clinical benefit of cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*2012;107(4):626-31.
23. Therasse P, Arbutk SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(3):205-16. 64.
24. Clark DP. Seize the opportunity: underutilization of fine-needle aspiration biopsy to inform targeted cancer therapy decisions. *Cancer Cytopathol* 2009;117(5):289-97. -
25. Han HS, Lim SN, An JY, Lee KM, Choe KH, Lee KH, et al. Detection of EGFR mutation status in lung adenocarcinoma specimens with different proportions of tumor cells using two methods of differential sensitivity. *J Thorac Oncol*2012;7(2):355
26. Savic S, Tapia C, Grilli B, Ruffe A, Bihl MP, de Vito Barascud A, et al. Comprehensive epidermal growth factor receptor gene analysis from cytological specimens of non-small-cell lung cancers. *Br J Cancer* 2008;98(1):154-60.
27. Yatabe Y, Matsuo K, Mitsudomi T. Heterogeneous distribution of EGFR mutations is extremely rare in lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol*2011;29(22):2972-7.
28. Soh J, Toyooka S, Aoe K, Asano H, Ichihara S, Katayama H, et al. Usefulness of EGFR mutation screening in pleural fluid to predict the clinical outcome of gefitinib treated patients with lung cancer. *Int J Cancer* 2006;119(10):2353-8.
29. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, et al. High sensitivity detection of epidermal growth factor receptor mutations in the pleural effusion of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Sci* 2006;97(7):642-8.

	<b>Citologia</b>	<b>Istologia</b>		<i>p</i>
	364	318		
<b>Sesso</b>				
<i>Femminile</i>	92	94		0,12
<i>Maschile</i>	272	224		
<b>Abitudine al fumo</b>				
<i>Fumatore</i>	116	102		0,5
<i>Non Fumatore</i>	248	216		
<b>Tipo di NSCLC</b>				
<i>ADC</i>	227	215	442	0.08
<i>SCC</i>	21	24	45	
<i>NSCLC favour ADC</i>	51	33	83	
<i>NSCLC favour SCC</i>	6	3	9	
<i>NOS</i>			74	
<i>Altri</i>	59	43	29	

**Tabella 1.** Caratteristiche cliniche dei pazienti e dei tumori analizzati

<b>Campione</b>	<b>Numero casi testati</b>	<b>Numero casi non processati</b>	<b>Totale casi testati</b>	<b>% di casi non processati</b>
<b>FNA</b>	235	39	274	14,20%
<b>TBNA</b>	25	6	31	19,30%
<b>Effusione Pleurica</b>	24	6	30	20%
<b>Lavaggio/Brushing Bronchiale</b>	20	7	27	24,13%
<b>Espettorato</b>	1	1	2	50%
<b>Totale</b>	305	59	364	

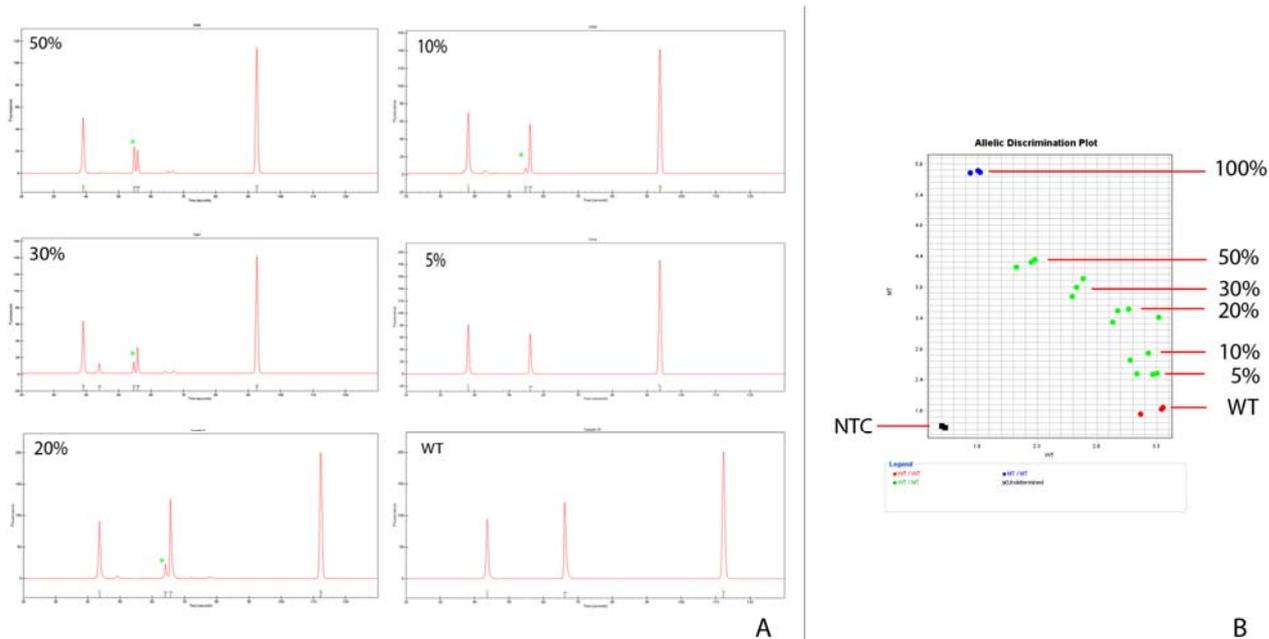
**Tabella 2.** Metodo di prelievo e percentuale di campioni citologici non processati

	<b>Percentuale di mutazione</b>
<b>Citologia n =294</b>	<b>27/52 (51,9%)</b>
<b>Istologia n =304</b>	<b>25/52 (48,1%)</b>
<b>Femmine</b>	<b>32/52 (61,5%)</b>
<b>Maschi</b>	<b>20/52 (38,4%)</b>
<b>Abitudine al Fumo</b>	
<b>Fumatore</b>	<b>10/52 (19,2%)</b>
<b>Non Fumatore</b>	<b>42/52 (80,7%)</b>
<b>Istotipo</b>	
<b>ADC</b>	<b>42/52 (80,7%)</b>
<b>SCC</b>	<b>1/52 (1,9%)</b>
<b>NSCLC favour ADC</b>	<b>6/52 (11.5%)</b>
<b>NSCLC favour SCC</b>	<b>0/52 (0%)</b>
<b>NSCLC-NOS</b>	<b>3/52 (3,7%)</b>
<b>Altro</b>	<b>0/52 (0%)</b>

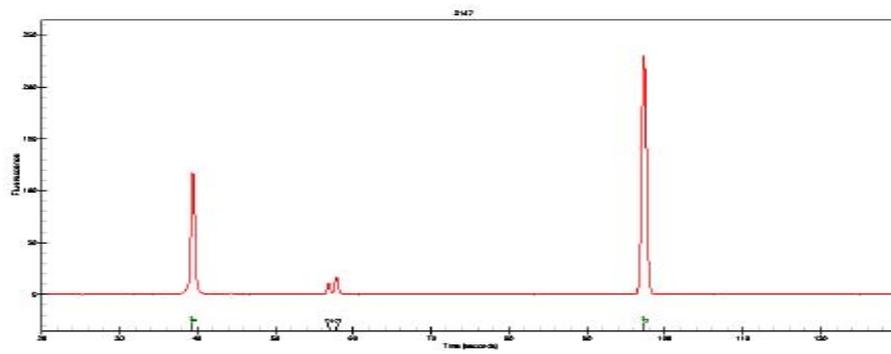
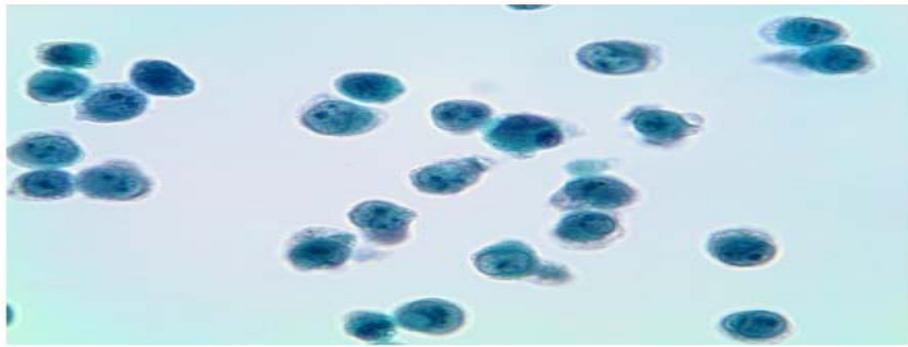
**Tabella 3.** Distribuzione delle mutazioni in relazione alle caratteristiche cliniche

	<b>CITO</b>	<b>ISTO</b>	<b>TOTALE</b>
<b>RESPONSIVI</b>	8 (61.5%)	7 (53.8%)	15
<b>NON RESPONSIVI</b>	5 (38.5%)	6 (46.2%)	11
<b>TOTALE</b>	13	13	26

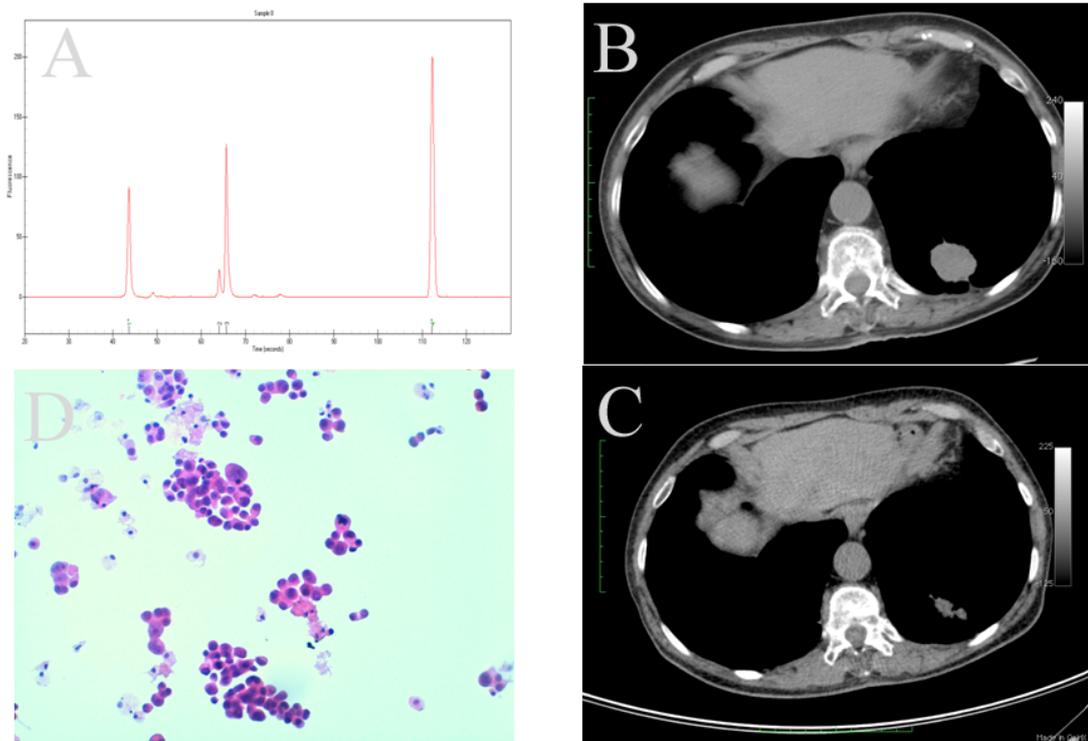
**Tabella 4 .** Dati della risposta al trattamento con gefitinib in pazienti le cui mutazioni sono state rilevate su campione citologico o su campione istologico.



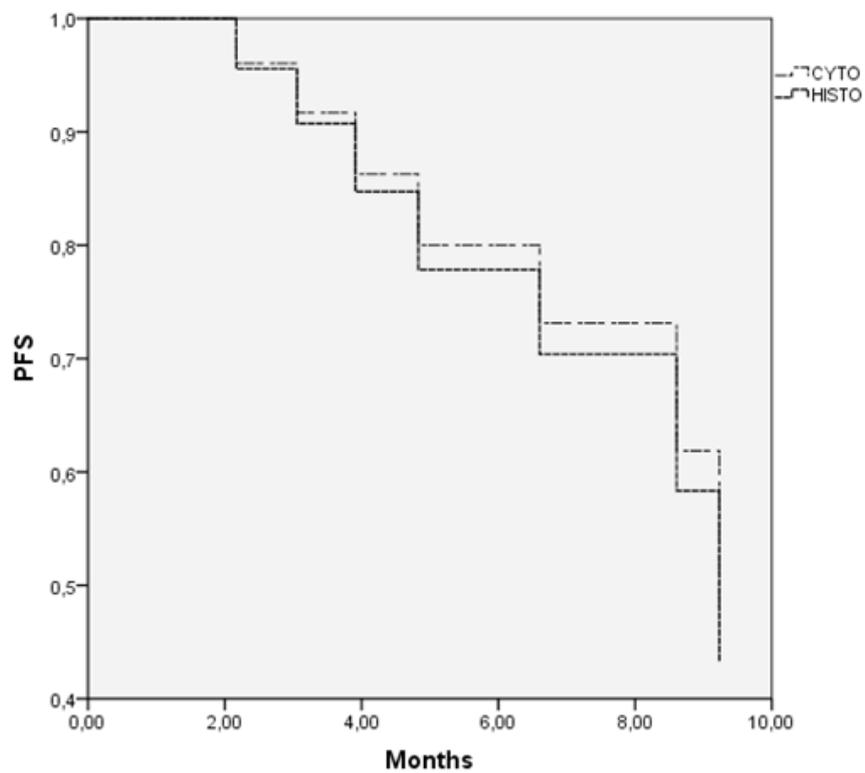
**Figura 1:** Definizione della sensibilità analitica della tecnica di rilevamento delle mutazioni di EGFR (percentuale minima di allele mutato rilevabile). Diluizioni seriali di linee cellulari mutate (PC9 e H1975) e della linea nativa (A549 EGFR) nelle proporzioni del 50%, 30%, 20%, 10%, 5%. Come mostrato nel pannello A (indicato da un punto verde sul picco), il limite di rilevazione per la mutazione dell'esone 19 è del 10%, mentre come mostrato nel pannello B, il limite di rilevazione della mutazione puntiforme L858R dell'esone 21 è del 5%.



**Figura 2.** Definizione della sensibilità analitica delle mutazioni di EGFR (numero minimo di cellule mutate rilevabili). 25 cellule della linea cellulare PC9 (parte superiore) prelevate grazie a micro dissezione laser sono sufficienti per il rilevamento della delezione dell'esone 19 di EGFR.



**Figura 3.** Delezione dell'esone 19 di EGFR, identificata dall'analisi di lunghezza dei frammenti (A) su cellule di ADC (C) di un paziente con dati clinici (CT prima [B] e durante [D] il trattamento) di risposta parziale (PR) al trattamento con gefitinib. In questo caso la sequenza nucleotidica rilevata dal metodo di Sanger era nativa (assenza di delezione).



**Figura 4.** Dati di PFS di pazienti trattati con gefitinib dopo rilevamento della mutazione di EGFR su istologia o su citologia. I dati appaiono non significativamente differenti ( $p = 0.88$ ) e le curve sec. Kaplan – Mayer presentano una simile andamento

