

Modulo di Diagnostica molecolare su tessuto

7 dicembre 2023 – Argomenti della lezione

Diagnostica molecolare del carcinoma del polmone

Patologia polmonare

I tumori polmonari maligni (carcinomi)

Classificazione

Il 95% dei carcinomi polmonari appartiene alle seguenti categorie

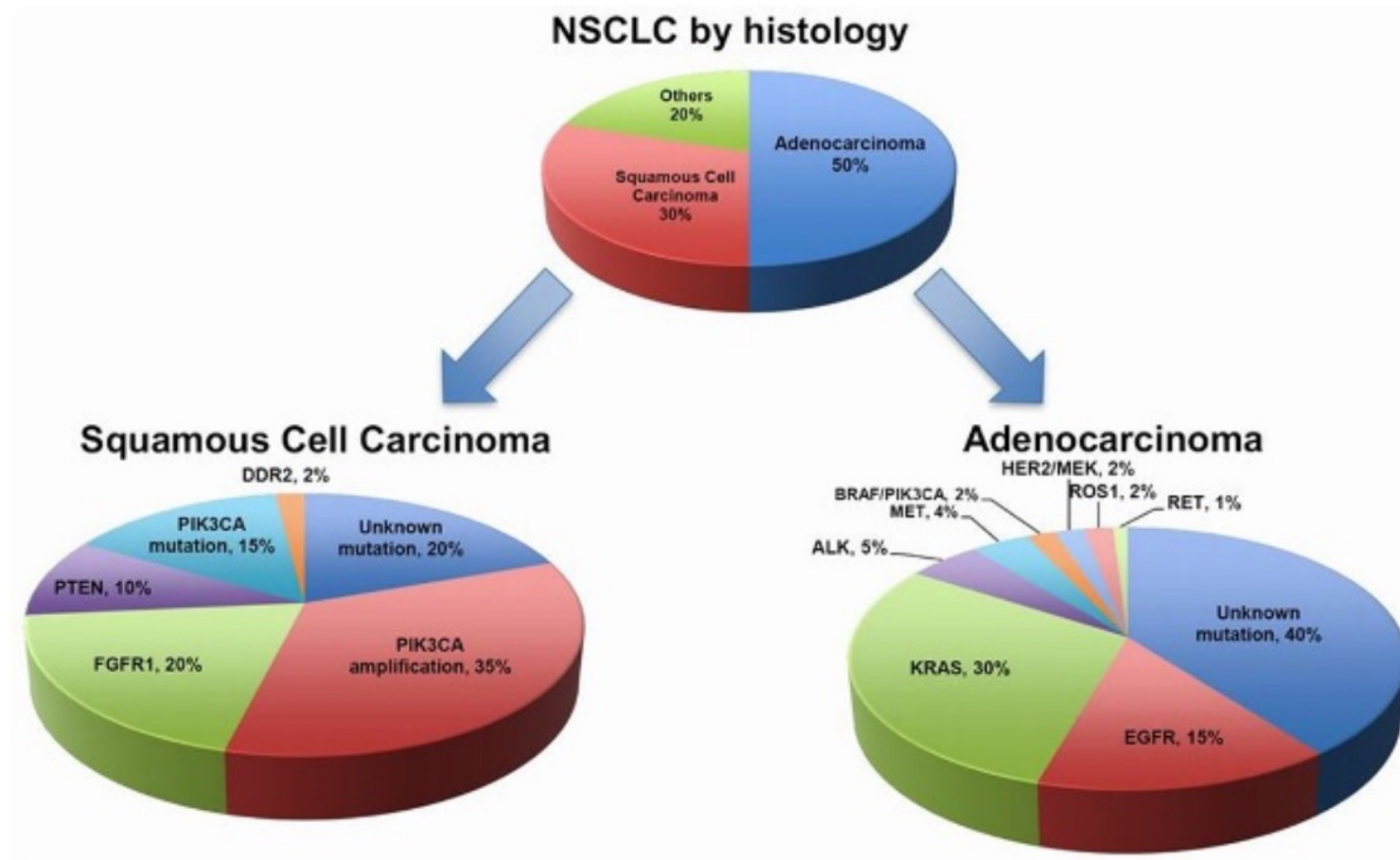
1. Carcinoma squamoso
2. Adenocarcinoma
3. Carcinoma a piccole cellule (microcitoma)
4. Carcinoma a grandi cellule

ORIGINE DEI TUMORI POLMONARI

Il carcinoma polmonare deriva dalla proliferazione di gruppi maligni di cellule epiteliali o neuroendocrine delle piccole vie aeree o di quelle centrali del sistema bronchiale.

Dal punto di vista pratico (terapeutico) è fondamentale la distinzione **tra microcitomi e non microcitomi** che vengono trattati in maniera diversa

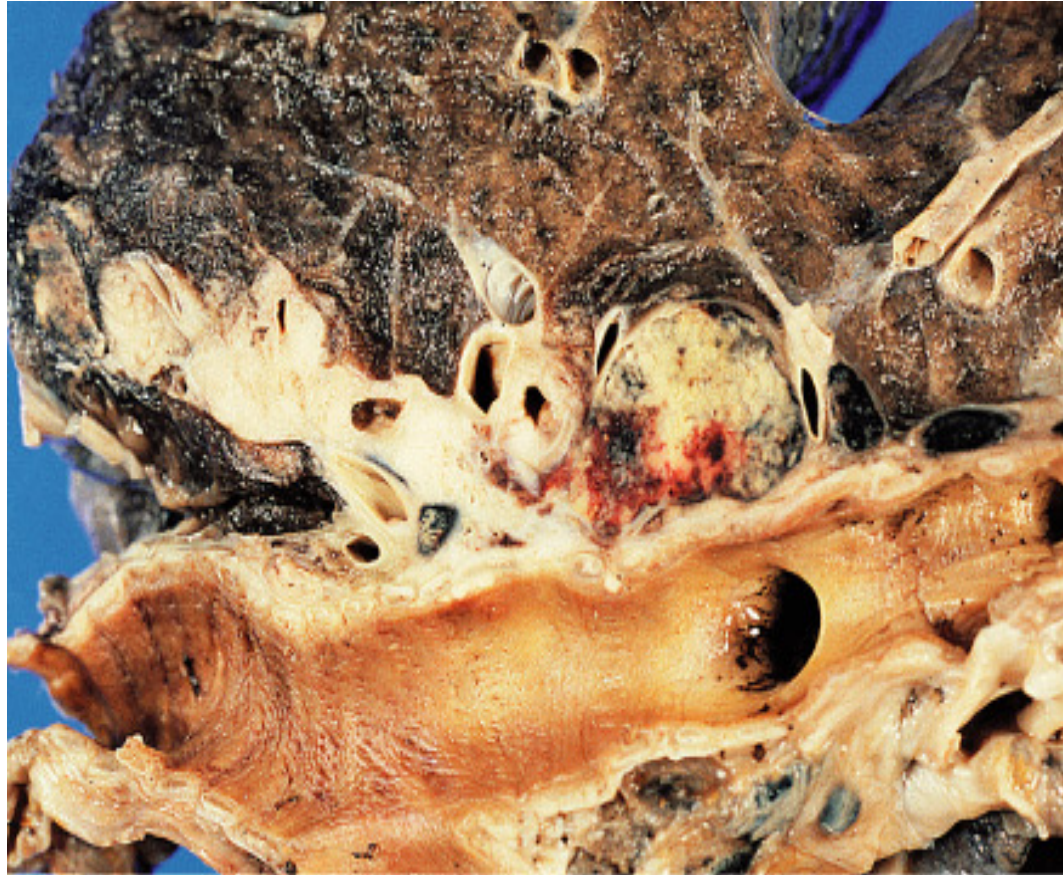
La classificazione istopatologica raccomandata per il tumore polmonare è quella della World Health Organization (WHO). Più del 95% dei carcinomi polmonari è riconducibile a quattro istotipi principali: carcinoma squamoso (CS), adenocarcinoma (ADC) e carcinoma a piccole cellule o microcitoma



Patologia polmonare

I tumori polmonari maligni (carcinomi)

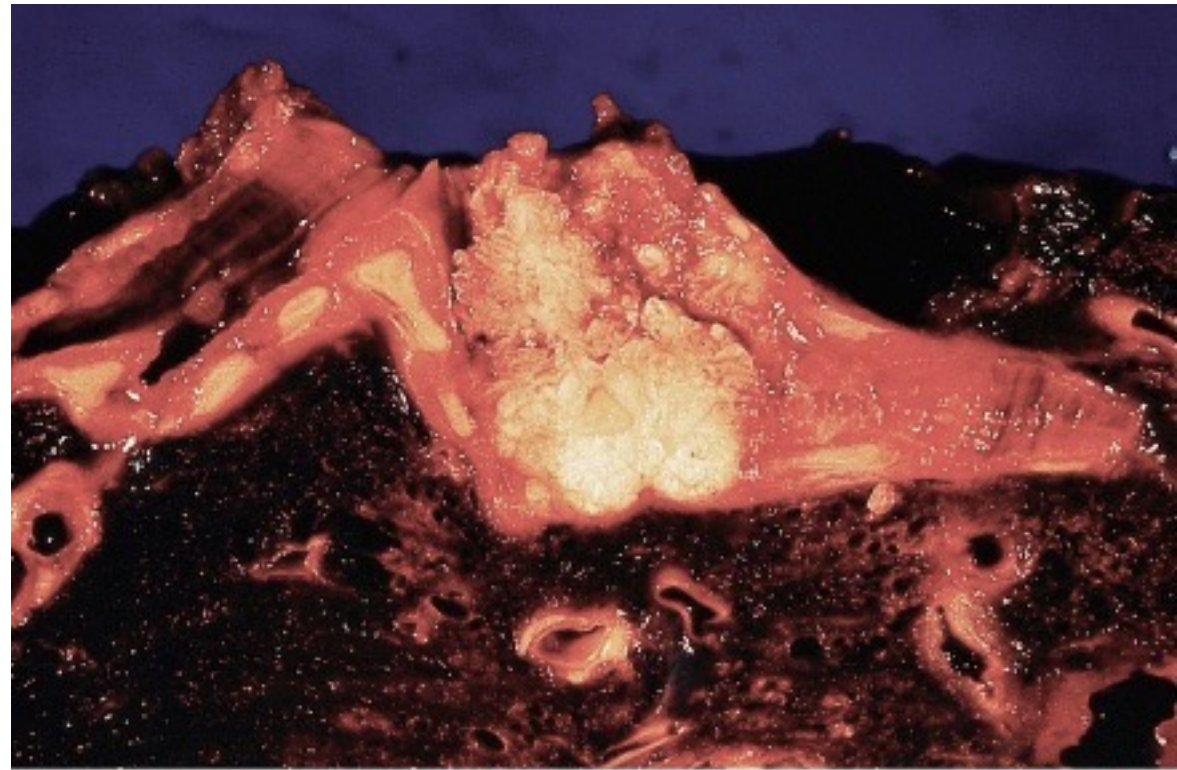
Aspetto macroscopico di un carcinoma polmonare (forma centrale); la neoplasia origina da un bronco principale e si estende verso il parenchima polmonare adiacente



Patologia polmonare

I tumori polmonari maligni (carcinomi)

**Carcinoma polmonare
Ostruente il lume
bronchiale**



Patologia polmonare

I tumori polmonari maligni (carcinomi)

Adenocarcinoma polmonare
A localizzazione periferica



© Elsevier Inc 2004 Rosai and Ackerman's Surgical Pathology 9e

Patologia polmonare

I tumori polmonari maligni (carcinomi)

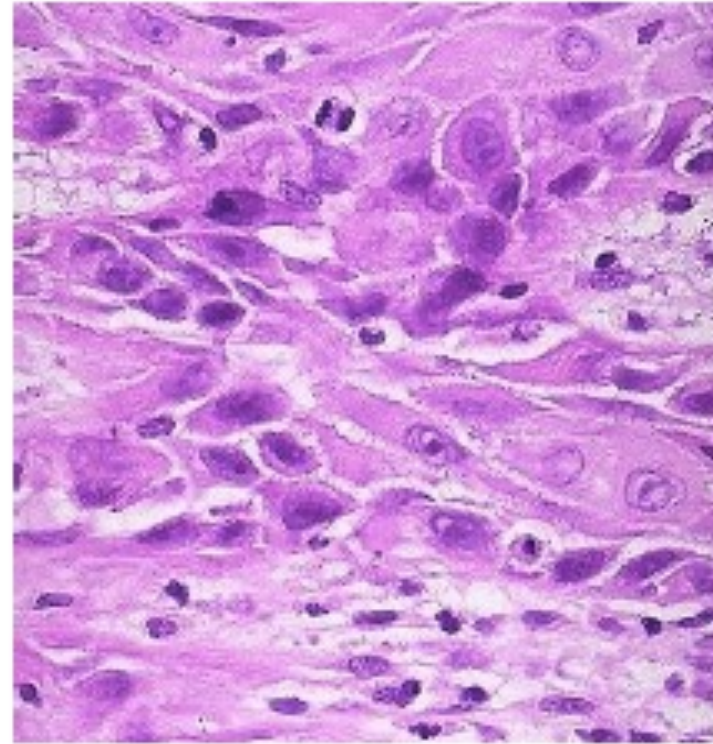
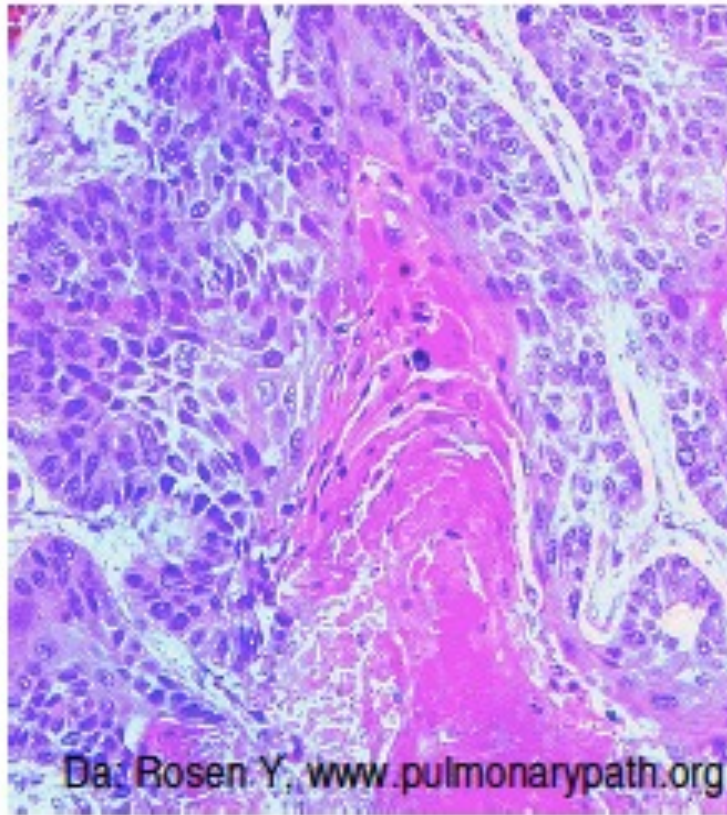
**Neoplasia polmonare
con infiltrazione
della pleura**



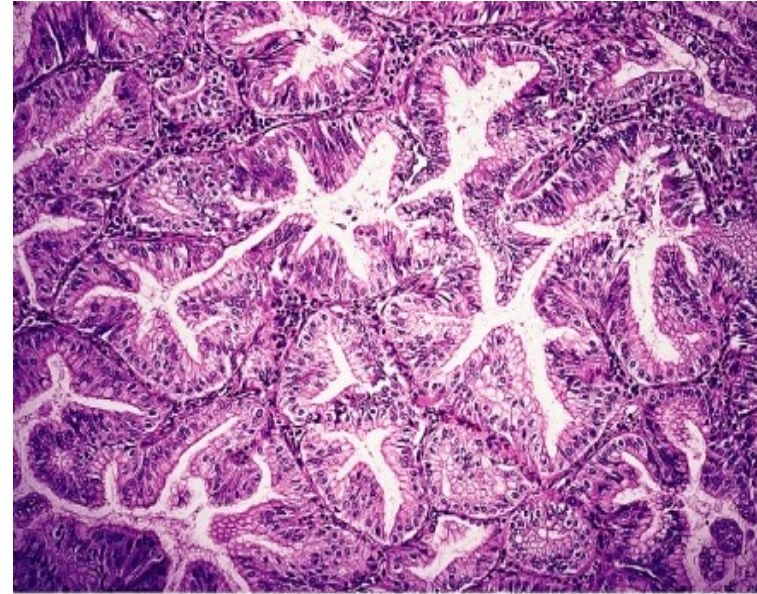
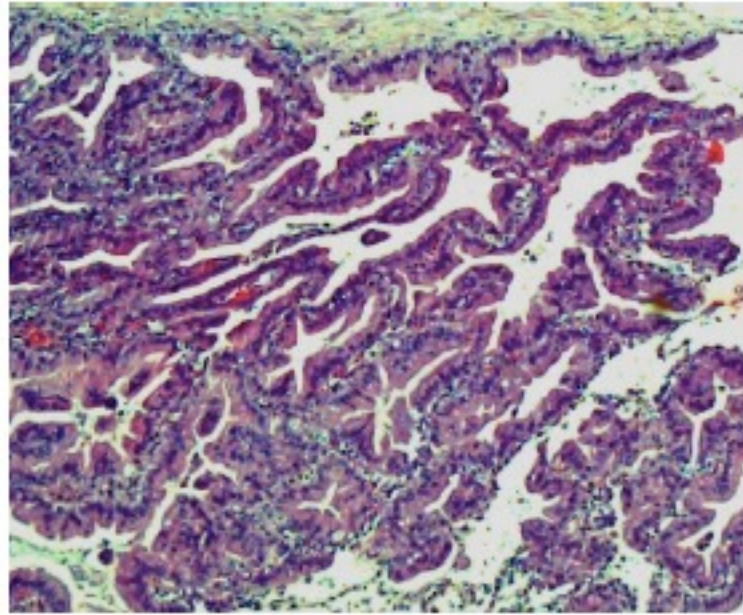
© Elsevier Inc 2004 Rosai and Ackerman's Surgical Pathology 9e

CARCINOMA SQUAMOCELLULARE

con aree di cheratinizzazione e/o ponti intercellulari



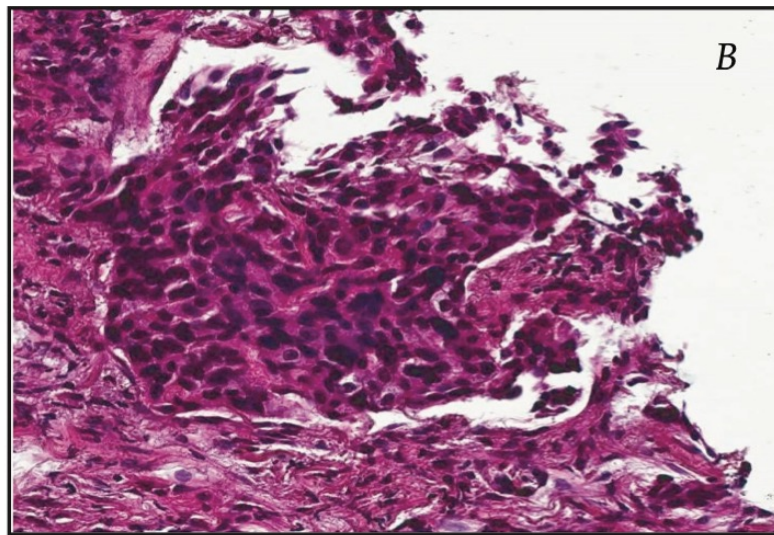
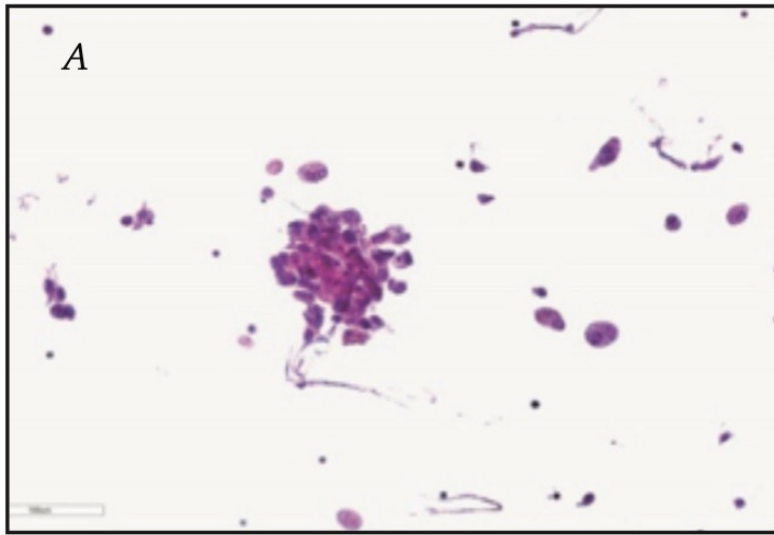
Adenocarcinoma: neoplasia epiteliale maligna presentante differenziazione ghiandolare o produzione di muco..



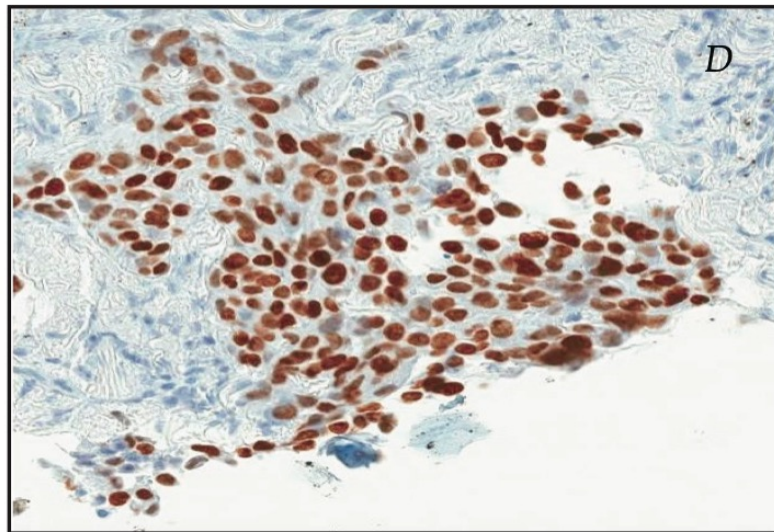
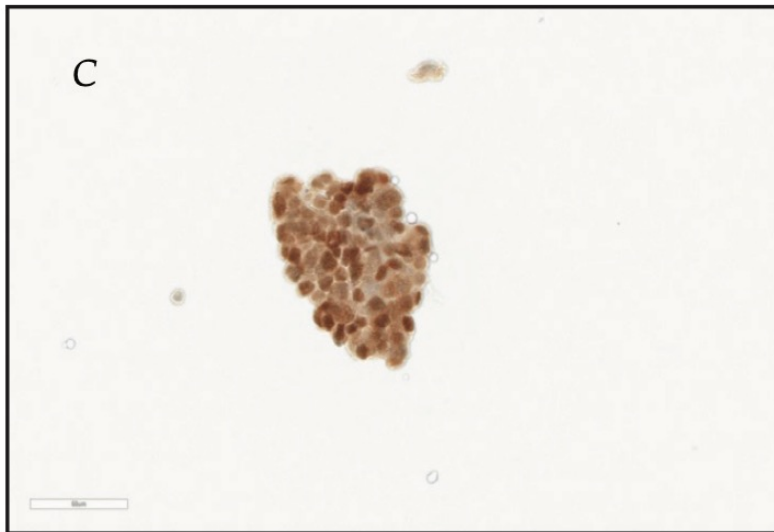
ADENOCARCINOMA è solitamente positivo per TTF-1 (Thyroid Transcription Factor-1), citocheratina 7 (CK7) e napsina

CARCINOMA SQUAMOSO esprime p63, p40, citocheratine ad alto peso molecolare (ad es. CK5/6)

Cromogranina, sinaptofisina, CD56 sono i migliori marcatori per le neoplasie a differenziazione neuroendocrina del polmone come il microcitoma



E/E



TTF1

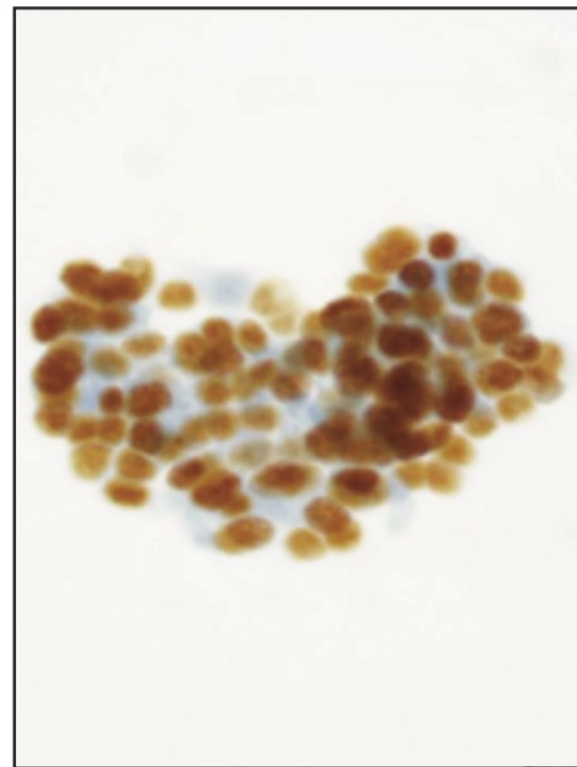
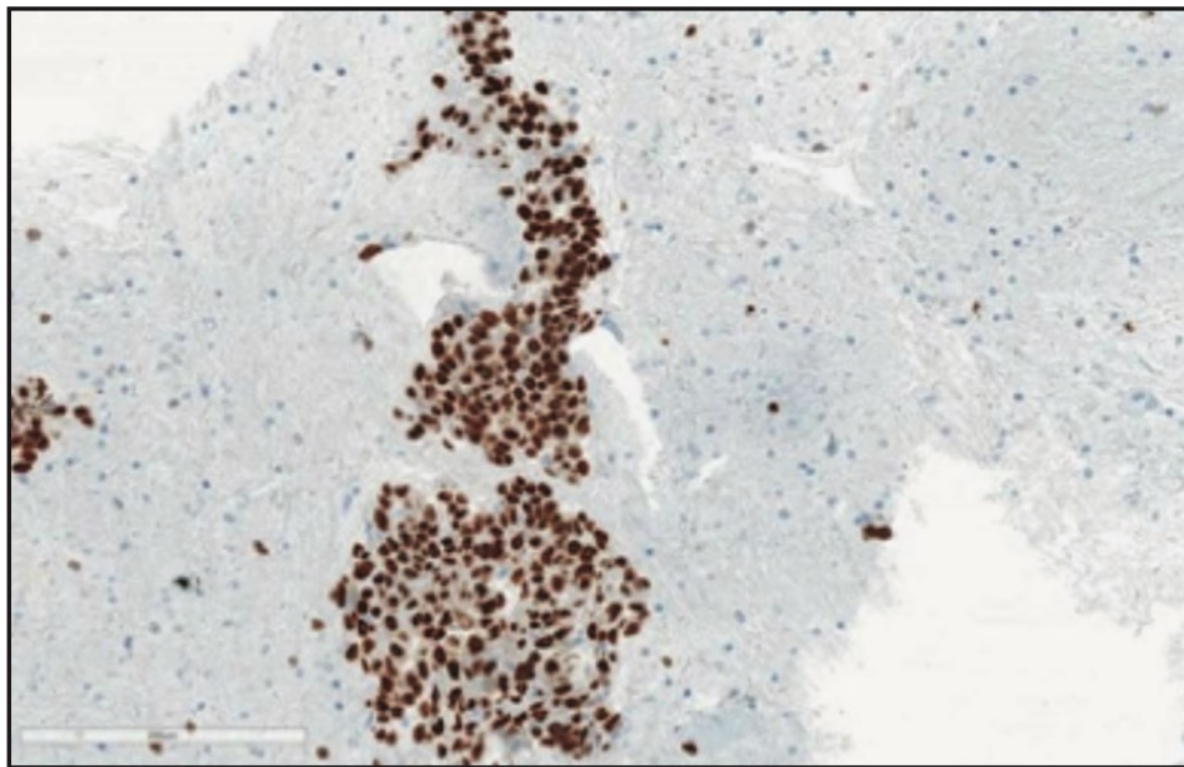
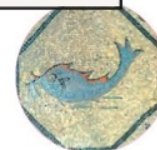


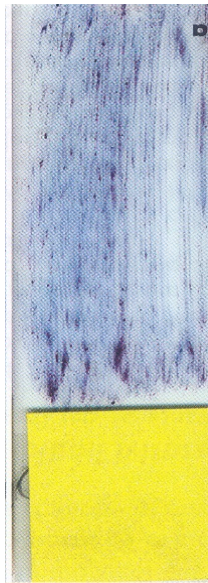
Figura 9. Immagini di squamoso positivi per p40.



Il campione

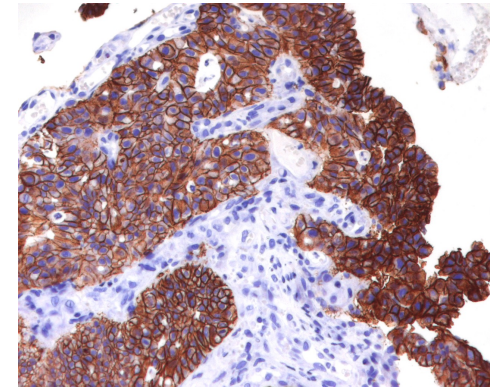


Preparato istologico

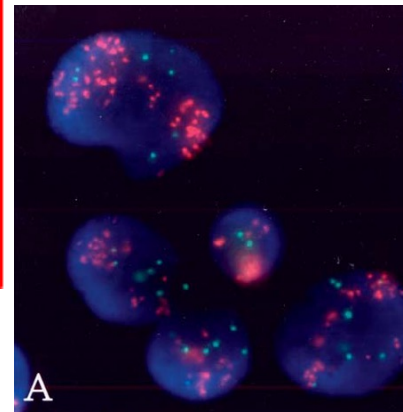


citologico

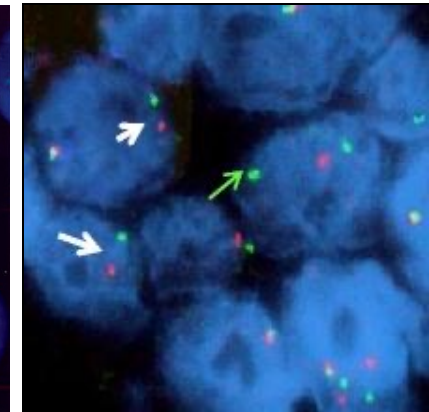
- Copy Number Variations
- Somatic Mutations
- Rearrangements
- Fusion genes
- SNPs
- Methylation
- Gene Expression



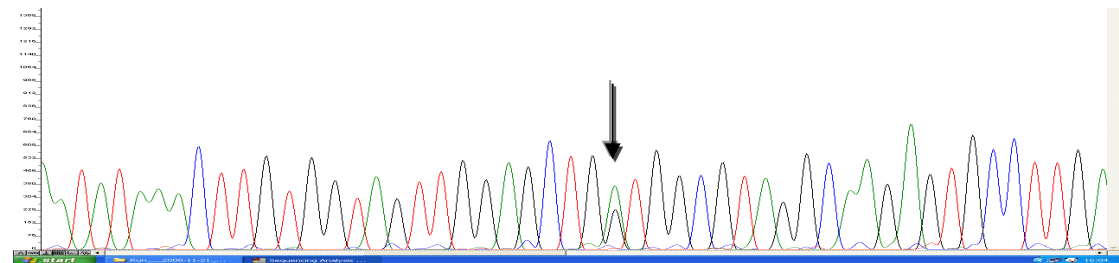
Iperespressione della proteina (IIC)



amplificazione



traslocazione

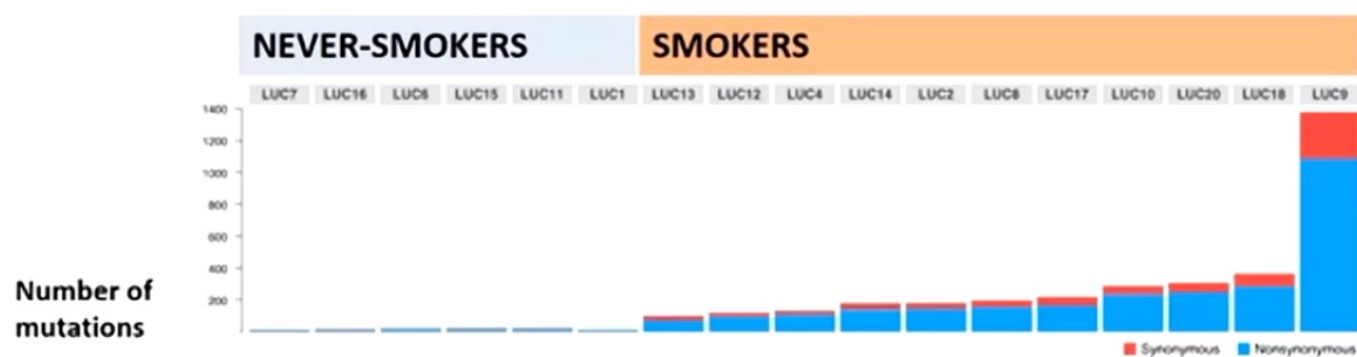


sequenza

Genomic Landscape of Non-Small Cell Lung Cancer in Smokers and Never-Smokers

Ramaswamy Govindan,^{1,2,9} Li Ding,^{1,3,4,9} Malachi Griffith,^{3,4} Janakiraman Subramanian,^{1,2} Nathan D. Dees,³ Krishna L. Kanchi,³ Christopher A. Maher,^{1,2,3} Robert Fulton,^{3,4} Lucinda Fulton,^{3,4} John Wallis,^{3,4} Ken Chen,⁸ Jason Walker,³ Sandra McDonald,^{2,6} Ron Bose,^{1,2} David Omritz,⁵ Donghai Xiong,⁷ Ming You,⁷ David J. Dooling,^{3,4} Mark Watson,^{2,6} Elaine R. Mardis,^{2,3,4} and Richard K. Wilson^{2,3,4,*}

Cell. 2012 Sep 14;150:1121-34



Molte neoplasie dipendono da un singolo oncogene per la loro crescita e sopravvivenza - “**oncogene addiction**” o “oncogene driver”

Altre dipendono dall’alterazione di più geni inclusi TSG - «**oncogene expedience**»

‘Driver’ mutations and lung adenocarcinoma biology



Oncogene ‘Addiction’

Genetically simple tumours
NO tobacco carcinogenesis
Mutually exclusive drivers
Almost exclusively adenocarcinomas

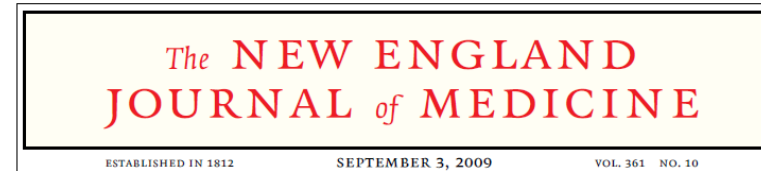


Oncogene ‘Expedience’

Genetically complex tumours
Tobacco carcinogenesis
Multiple drivers incl loss of TSG
Many adenocarcinomas, vast majority
of squamous and SCLC

Terapia dei tumori solidi “personalizzata” biomarker-dipendente – EGFR polmone

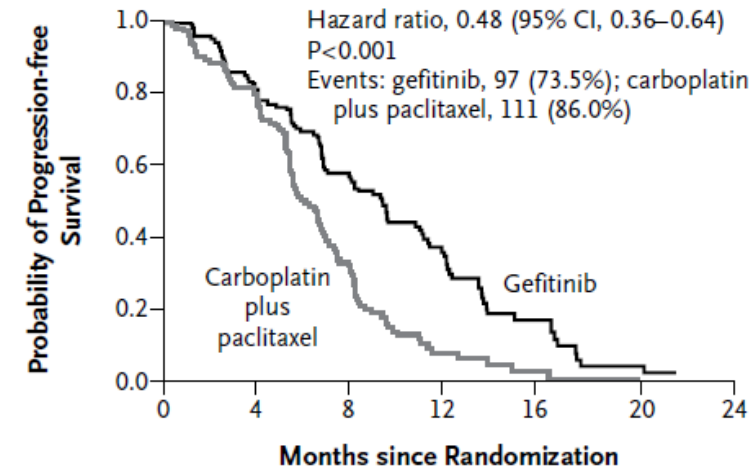
Studi clinici, condotti in Europa, Asia e Stati Uniti, in cui erlotinib, gefitinib o afatinib sono stati confrontati con la chemioterapia standard a base di platino, hanno dimostrato la netta superiorità dei primi rispetto alla chemioterapia, in termini di risposte obiettive, cioè di riduzione numerica e dimensionale delle lesioni e di sopravvivenza libera da progressione, cioè il tempo che intercorre tra l’inizio del trattamento di prima linea e la eventuale progressione di malattia. Gefitinib, erlotinib e afatinib determinano il 60-70% di risposte obiettive, mentre la chemioterapia solo il 35-40%.



Gefitinib or Carboplatin–Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma

Tony S. Mok, M.D., Yi-Long Wu, M.D., F.A.C.S., Sumittra Thongprasert, M.D., Chih-Hsin Yang, M.D., Ph.D., Da-Tong Chu, M.D., Nagahiro Saijo, M.D., Ph.D., Patrapim Sunpaweravong, M.D., Baohui Han, M.D., Benjamin Margono, M.D., Ph.D., F.C.C.P., Yukito Ichinose, M.D., Yutaka Nishiwaki, M.D., Ph.D., Yuichiro Ohe, M.D., Ph.D., Jin-Ji Yang, M.D., Busyamas Chewaskulyong, M.D., Haiyi Jiang, M.D., Emma L. Duffield, M.Sc., Claire L. Watkins, M.Sc., Alison A. Armour, F.R.C.R., and Masahiro Fukuoka, M.D., Ph.D.

B EGFR-Mutation–Positive



No. at Risk

Gefitinib	132	108	71	31	11	3	0
Carboplatin plus paclitaxel	129	103	37	7	2	1	0

La **caratterizzazione molecolare** dei tumori del polmone è un elemento fondamentale del percorso di diagnosi e cura del paziente, alla luce della possibilità di prescrivere trattamenti a bersaglio molecolare in popolazioni selezionate per la presenza o l'espressione di un determinato marcatore.

In tutti i pazienti con NSCLC in stadio **IIIB-IIIC e IV**
(**non candidati a trattamenti loco-regionali**)

raccomandato completare la diagnosi morfologica con la caratterizzazione delle mutazioni di **EGFR** (*Epidermal Growth Factor Receptor*), la definizione delle traslocazioni a carico di **ALK** (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) e **ROS-1** e la valutazione dei livelli di espressione del **PD – L1** (secondo i cut – off validati dagli studi clinici registrativi)

EGFR

Il gene EGFR (Fig.15) è localizzato sul braccio corto del cromosoma 7 alla posizione 12 (7p12).

EGFR

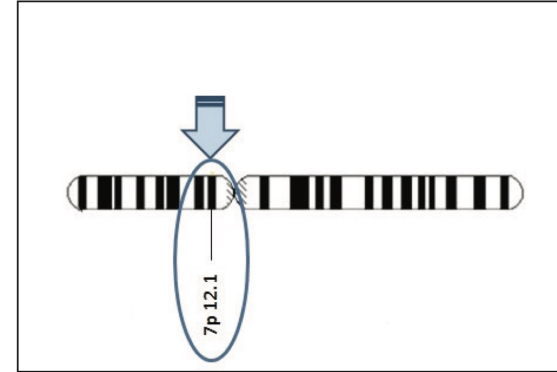


Figura 15. Localizzazione gene di EGFR.

Nel NSCLC (in particolare nel 15% degli ADC) sono state identificate mutazioni attivanti a carico degli esoni 18, 19, 20 e 21 di EGFR, che predicono una sensibilità, variabile in relazione al tipo di mutazione, alle terapie a bersaglio molecolare, rappresentate dagli inibitori tirosino – chinasi dell'EGFR, di prima (**gefitinib ed erlotinib**), seconda (**afatinib**) e terza generazione (**osimertinib**)

La presenza di **delezione** nell'esone 19 o di **mutazioni puntiformi** nell'esone 21 del gene EGFR sono quelle più frequenti.


Generalmente si osservano nei pazienti con **adenocarcinoma, non fumatori** e più frequentemente nelle donne rispetto agli uomini.

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


Figura 16. Siti di mutazioni del gene EGFR nei rispettivi esoni. Mutazione più frequente L858R (40-45%) nell'ex 21.

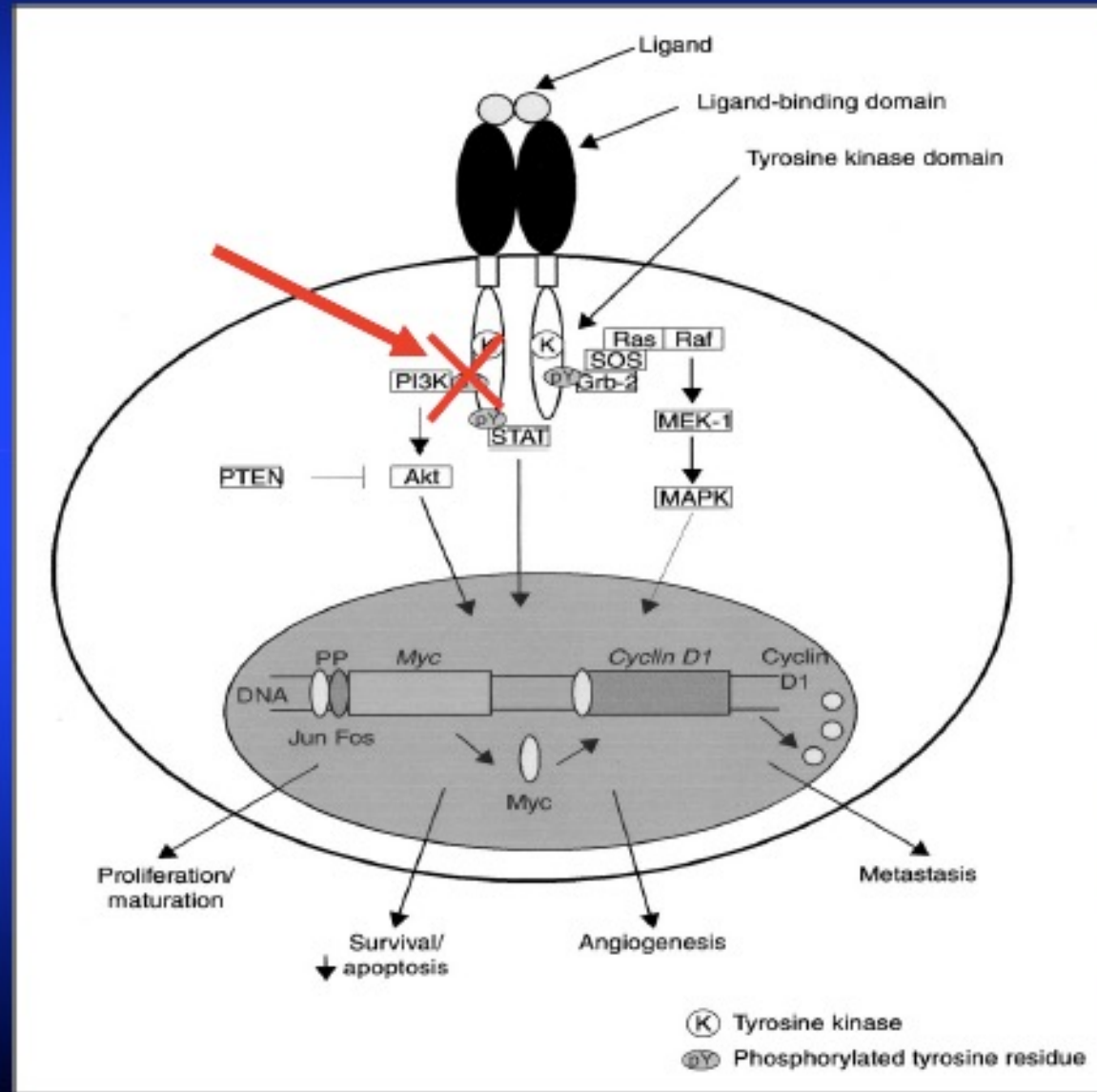
Terapia con farmaci biologici : Inibitori EGFR TK : Micromolecole

Gefitinib / Erlotinib

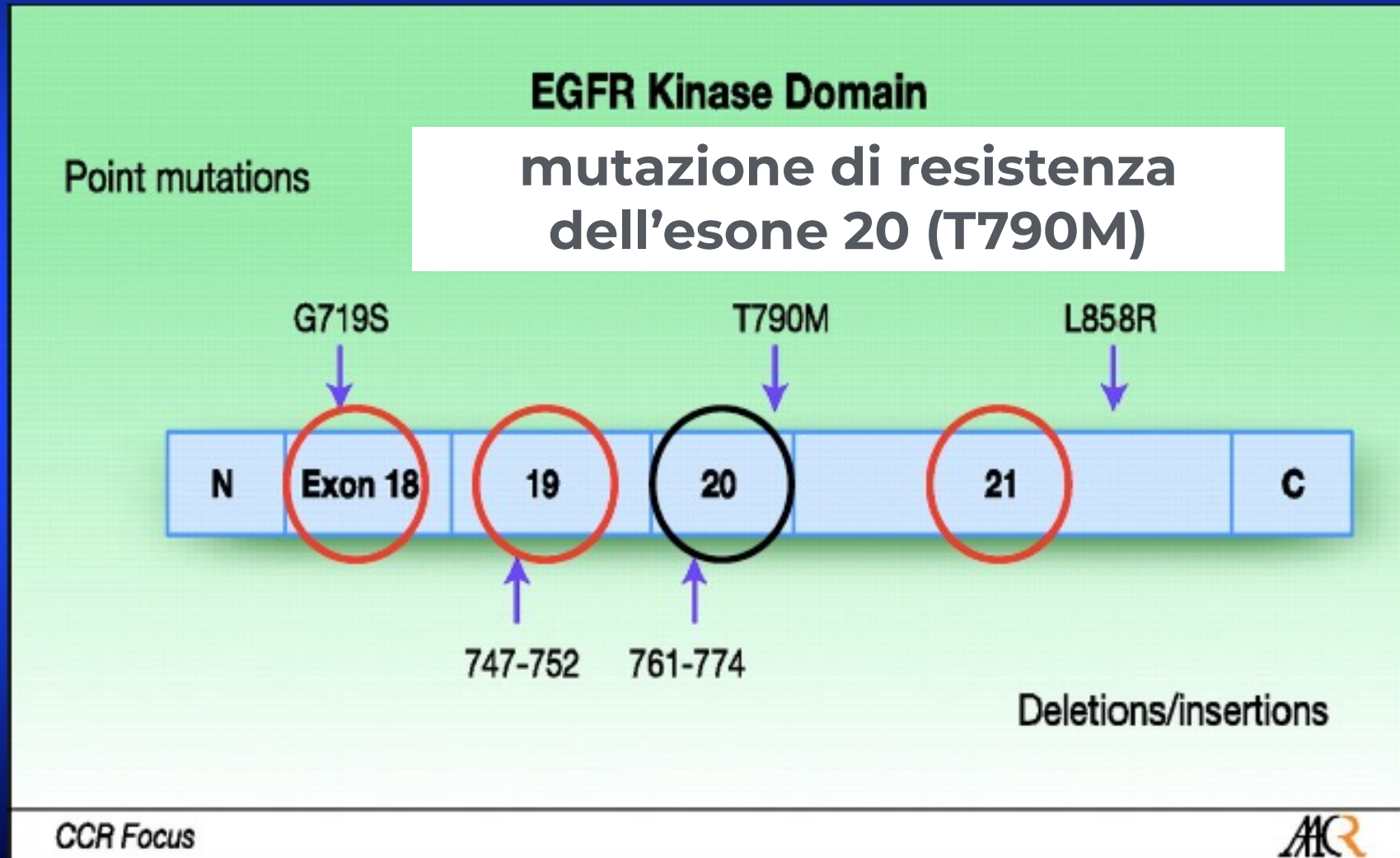
 **Blocco reversibile
autofosforilazione
tirosino-kinasica (TK)**

Interazione con ATP con
meccanismo competitivo

 blocco interazione tra
enzima e substrato
(TYR)



Mutazioni del dominio Tirosino-kinasico dell' EGFR nel carcinoma polmonare



Osimertinib (TERZA GENERAZIONE)

inibisce il recettore di EGFR quando presenta le mutazioni di sensibilità (delezione dell'esone 19 e mutazione dell'esone 21 L858R), ma anche in presenza di mutazione di resistenza dell'esone 20 (T790M).

Inoltre, osimertinib non si lega alla forma non mutata del recettore di EGFR, presente in alcuni tessuti del nostro corpo (la cute e l'apparato gastrointestinale), risultando quindi un trattamento con un migliore profilo di tossicità.

Terapia di prima linea per il tumore al polmone con mutazione EGFR

Gefitinib, erlotinib e afatinib hanno rappresentato lo standard terapeutico nel trattamento dei **pazienti con mutazione del gene EGFR**.

A chi va fatto il test?

Negli istotipi adenocarcinoma

Nei casi di carcinoma squamoso “puro” (p40 +/-TTF1-), il paziente può non essere testato in quanto quasi sicuramente EGFR non mutato, con l’eccezione dei rari casi di carcinoma squamoso in pazienti giovani o non fumatori, in cui il test va comunque eseguito.

Inoltre nei casi di carcinoma squamoso diagnosticato su piccole biopsie tissutali o su campioni citologici, si consiglia comunque di eseguire il test, in quanto non è possibile escludere la presenza di una componente mista (adeno/squamoso)

Determinazione delle mutazioni di *EGFR*

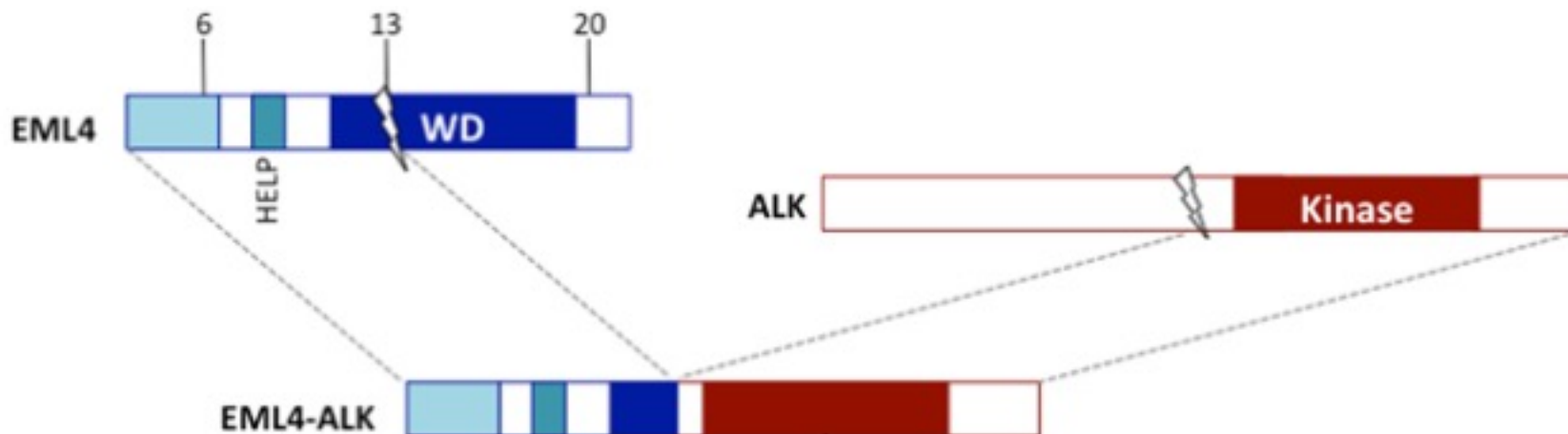
Su pezzo operatorio oppure su prelievo bioptico o citologico del tumore primitivo e/o della metastasi

Nei pazienti non fumatori, deboli fumatori (<15 pacchetti/anno o ≤ 5 sigarette al giorno) ed ex-fumatori (da ≥ 15 anni) con gli istotipi suddetti, in cui la biopsia polmonare standard non riesca a fornire una quantità/qualità di materiale tissutale/citologico adeguato all'analisi molecolare è indicata l'analisi delle alterazioni a carico degli esoni 18, 19, 20 e 21 di EGFR su DNA tumorale circolante (ctDNA) estratto da sangue periferico (plasma)

Cos'è la traslocazione del gene EML4-ALK?

Il **gene EML4-ALK** è il risultato di un riarrangiamento cromosomico, in cui, a causa di eventi casuali, una parte del gene EML4 (la sua porzione N-terminale) si stacca e si unisce alla porzione del gene ALK, contenente il dominio chinasi. Il risultato è la formazione di un nuovo gene che può dare origine allo sviluppo di un **adenocarcinoma del polmone**.

La traslocazione del gene Alk (Anaplastic Lymphoma Kinase - Chinasi del Linfoma Anaplastico) riguarda **circa 5% dei pazienti con diagnosi di adenocarcinoma polmonare**. Si tratta di un **tumore maligno** che colpisce soprattutto le persone tra i **45 e 50 anni di età**. A differenza di [altri tipi di tumore al polmone](#), il tumore ALK positivo si riscontra **generalmente nei non fumatori**.

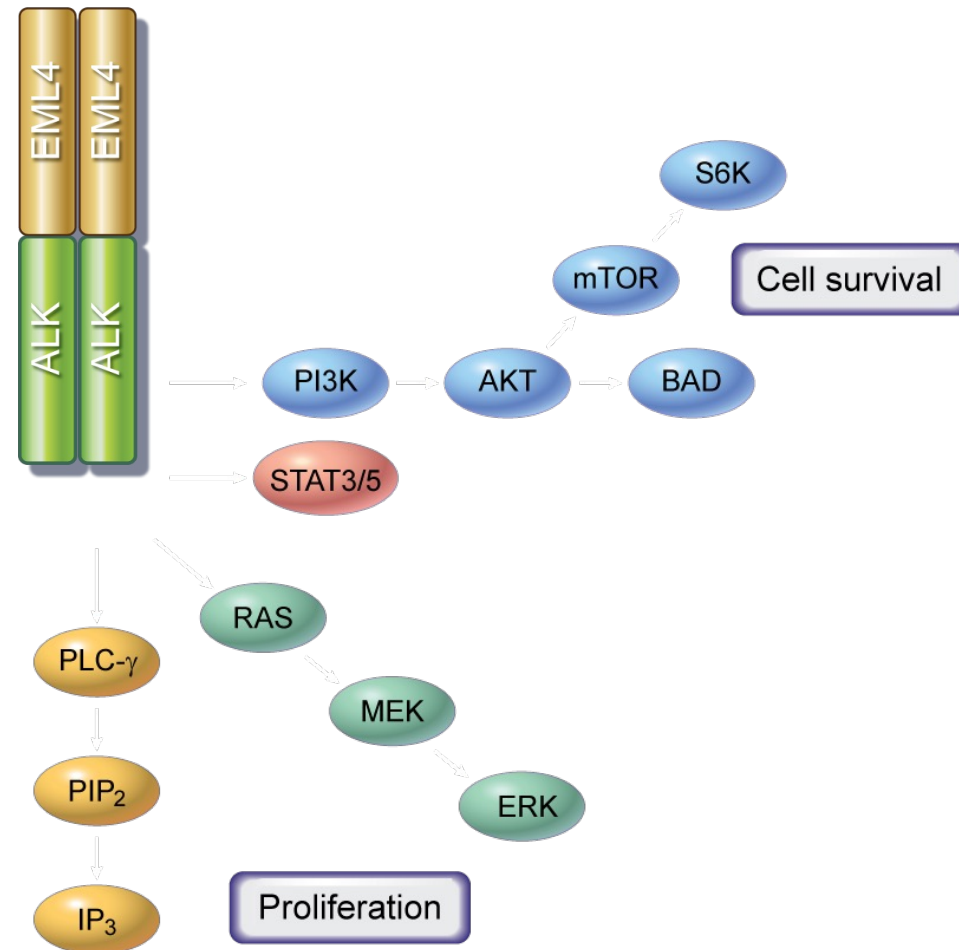


ALK

Riarrangiamento dell'oncogene *ALK* con *EML-4* o con altri partner di fusione sul braccio corto del cromosoma 2, che genera una specifica proteina dotata di attività tirosino-chinasica e coinvolta nei processi di sopravvivenza e proliferazione cellulare.

- 6-7%
- Mutualmente esclusiva con EGFR

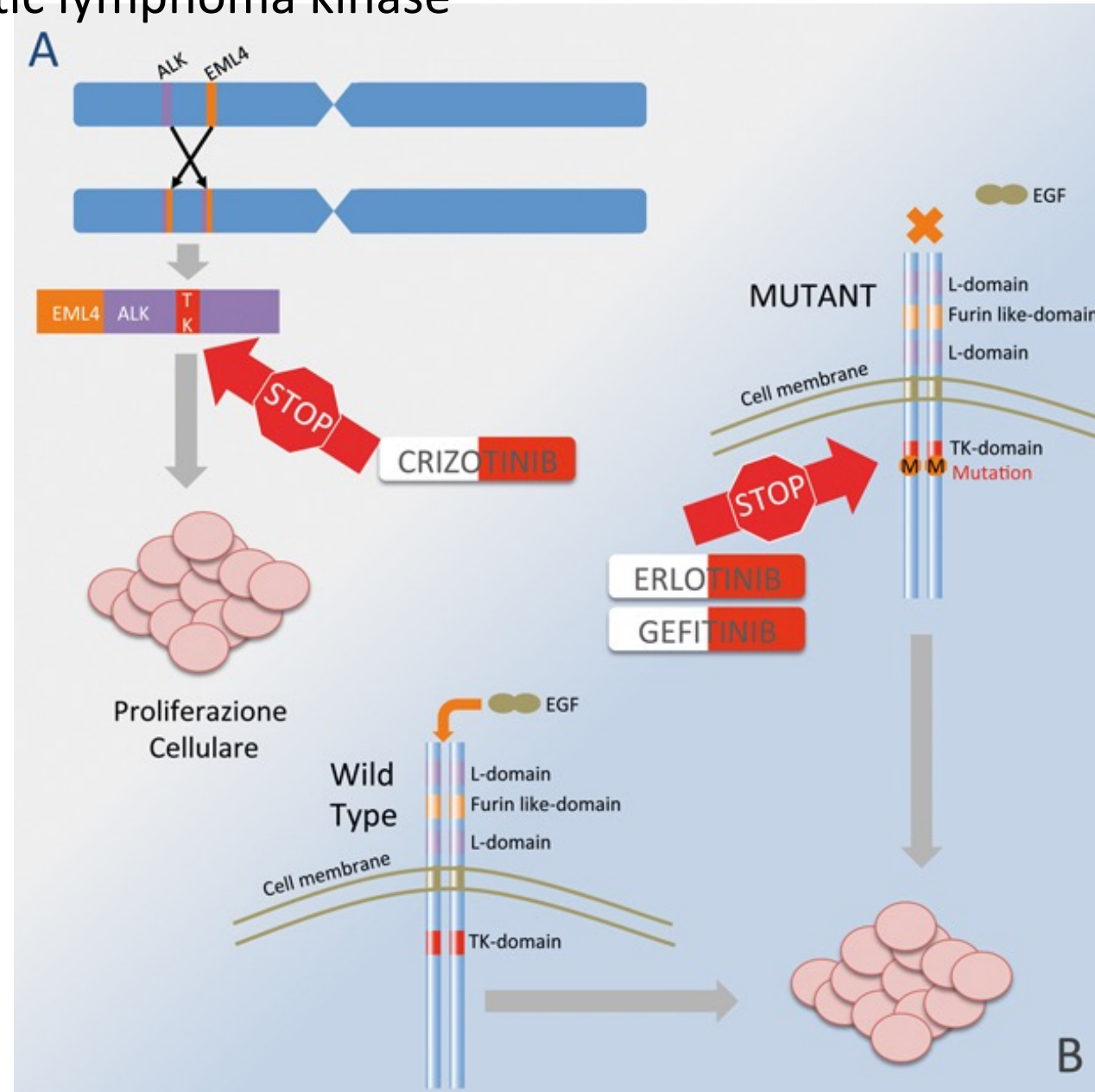
Signaling pathways activated by ALK



EML4=echinoderm-microtubule-associated protein like 4

ALK= anaplastic lymphoma kinase

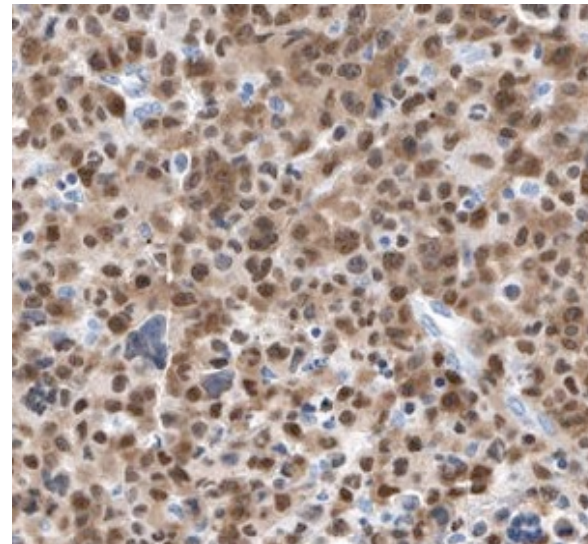
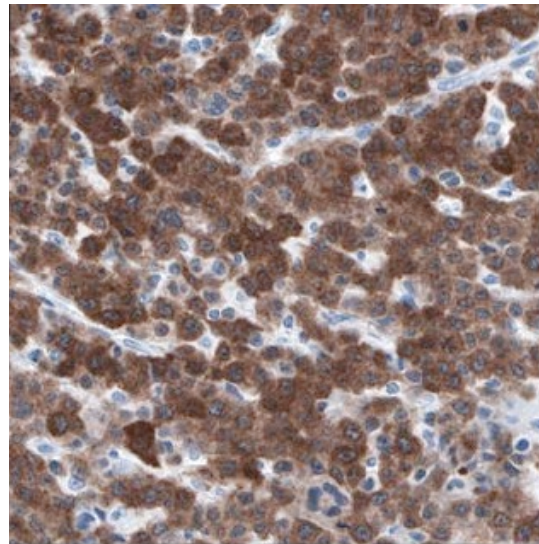
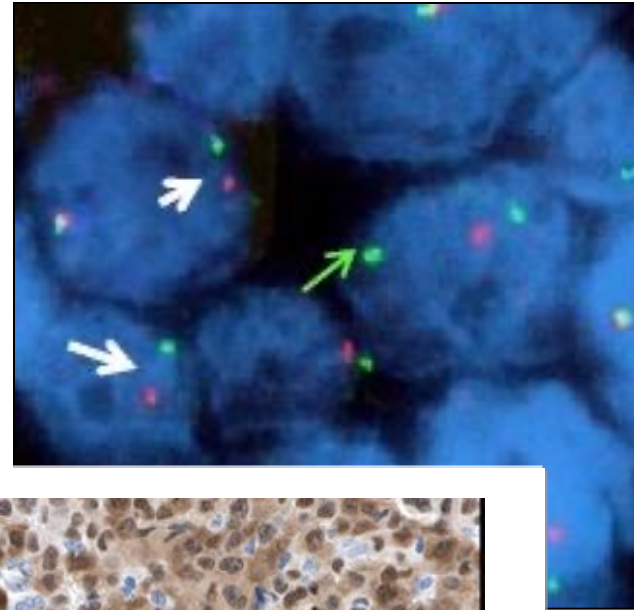
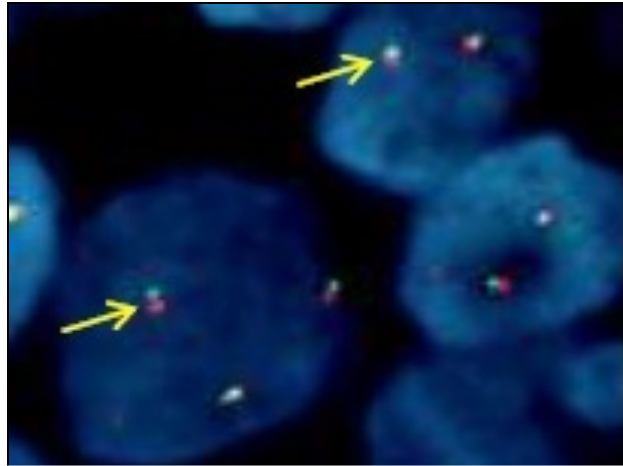
Un'inversione dell'intera regione del cromosoma 2p, genera la formazione di un prodotto del gene di fusione comprendente porzioni del gene EML4 e del gene ALK.



Relativamente alla determinazione dei riarrangiamenti di *ALK*:

- L'analisi di *ALK* trova indicazione nei pazienti con NSCLC con istotipo ADC, CGC, NSCLC misto con ADC e NSCLC N.A.S., che presentano la più alta probabilità di riscontro di riarrangiamenti del gene;
- La determinazione delle alterazioni di *ALK* può essere eseguita su pezzo operatorio, oppure su prelievo bioptico o citologico del tumore primitivo e/o della metastasi;
- Nei pazienti a più alta probabilità in assoluto di alterazioni di *ALK*, ovvero non fumatori, deboli fumatori (<15 pacchetti/anno o ≤ 5 sigarette al giorno) ed ex-fumatori (da ≥ 15 anni) con gli istotipi suddetti, per i quali non sia disponibile un adeguato materiale, può essere indicato un ulteriore prelievo bioptico per permettere la successiva determinazione molecolare qualora clinicamente indicato

Fusione EML4-ALK : FISH



Immunoistochimica per ALK

Inizialmente, l'indagine diagnostica di riferimento per la determinazione di *ALK* era la **FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*)**, anche se nell'approvazione, EMA faceva già riferimento alla positività di *ALK* con un "test validato" (es. IHC o RT-PCR)

La norma dell'autorizzazione della rimborsabilità di crizotinib da parte di AIFA specifica che i test utilizzabili per l'identificazione dei pazienti con riarrangiamento di *ALK*, eleggibili per il trattamento con crizotinib, sono sia l'IHC che la FISH. Per il **test FISH è previsto un *cut-off* del 15% di cellule neoplastiche riarrangiate per esprimere la positività.**

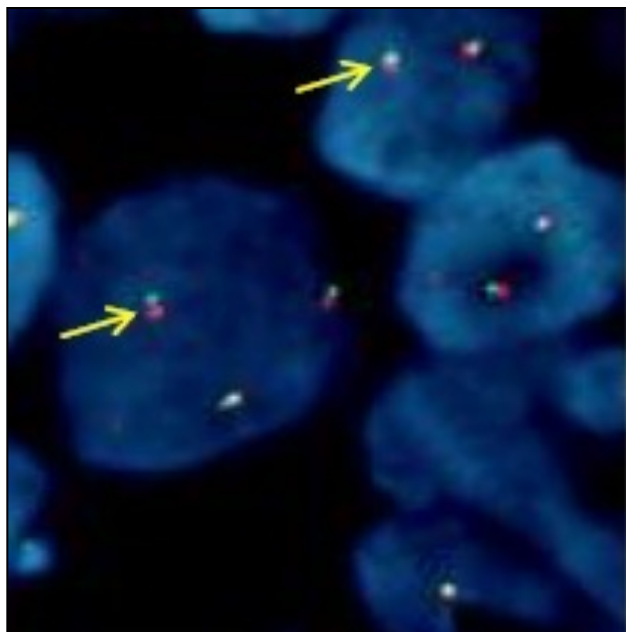
In IHC è possibile utilizzare diversi anticorpi anti-*ALK*. Il **KIT Ventana** con clone D5F3 prevede un risultato dicotomico di tipo positivo/negativo, mentre i **cloni 5A4 (Leica/Novocastra)**, e **ALK1 (Dako)** prevedono uno *score* negativo (0), debole (1+), moderato (2+) e forte (3+) [105, 110, 112].

Lo *score* 0 identifica un tumore negativo per *ALK*, lo *score* 3+ coincide con la positività per *ALK*, mentre è prevista l'ulteriore conferma con test FISH in caso di positività indeterminata con *score* 1+ e 2+

La sonda ALK Dual Color Break Apart

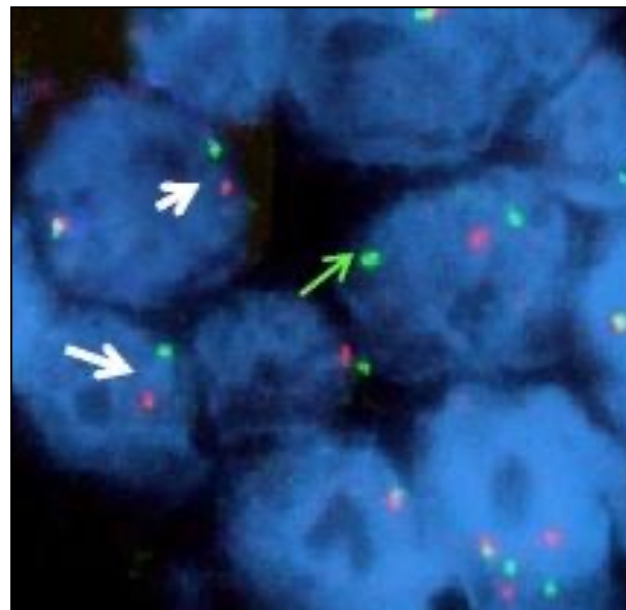
con filtri appropriati, produce segnale arancio e verde nelle zone di ibridazione della regione cromosomica 2p23.

Le cellule interfase normali o le cellule senza traslocazione 2p23 producono due segnali di fusione arancio/verde non separati



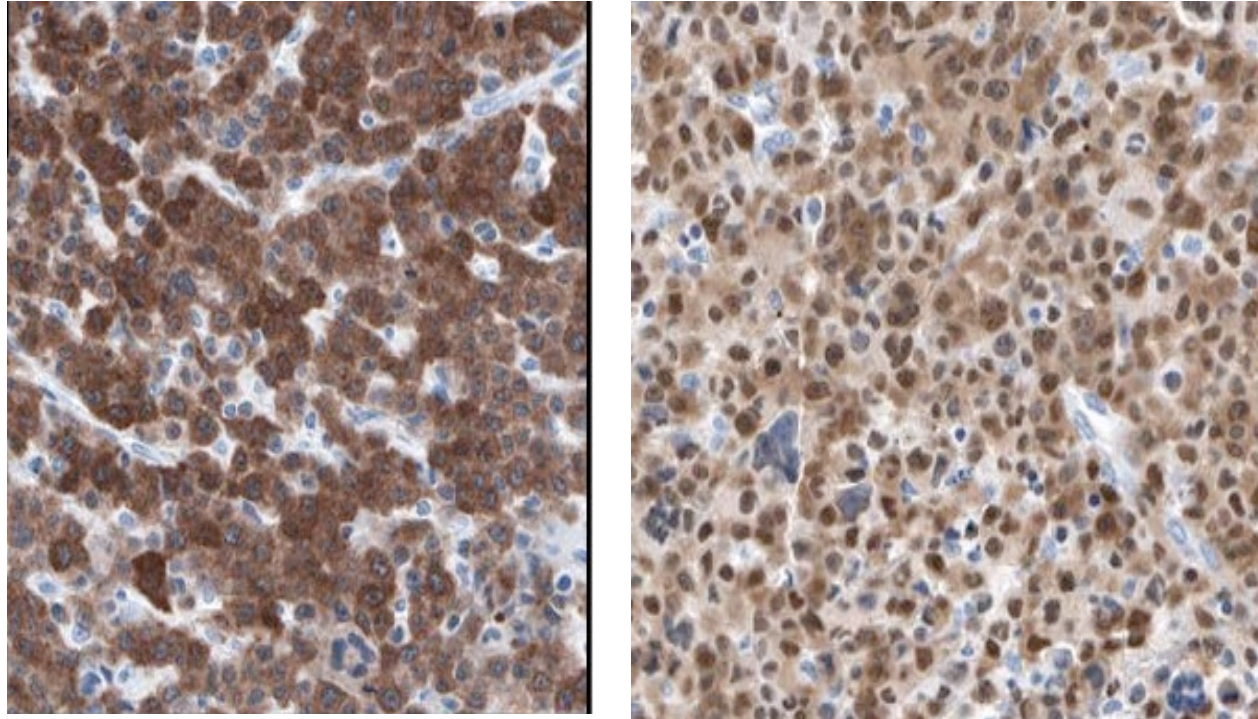
WT

Nelle regioni in cui c'è la traslocazione 2p23, si osservano un segnale verde ed un segnale arancione, separati uno dall'altro.



Riarrangiato

Risultato positivo: segnali separati in $\geq 15\%$ delle cellule neoplastiche



Immunostochimica per ALK

Vantaggi:

- si può utilizzare su materiale fissato in formalina ed incluso in paraffina/citologico;
- Si mantiene la morfologia tissutale

Svantaggi:

Non può distinguere tra le varianti delle fusioni EML4-ALK.

Approccio terapeutico nei pazienti affetti da tumore al polmone con traslocazione del gene EML4-ALK - Terapia di prima linea

Il **Crizotinib** è il trattamento standard per la terapia di prima linea dei pazienti con traslocazione del gene EML4-ALK. È un farmaco orale, disponibile in capsule rigide.

Il gene Ros 1 un recettore tirosinchinasico della famiglia dei recettori per l'insulina è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 6 in posizione 22 (6q22).

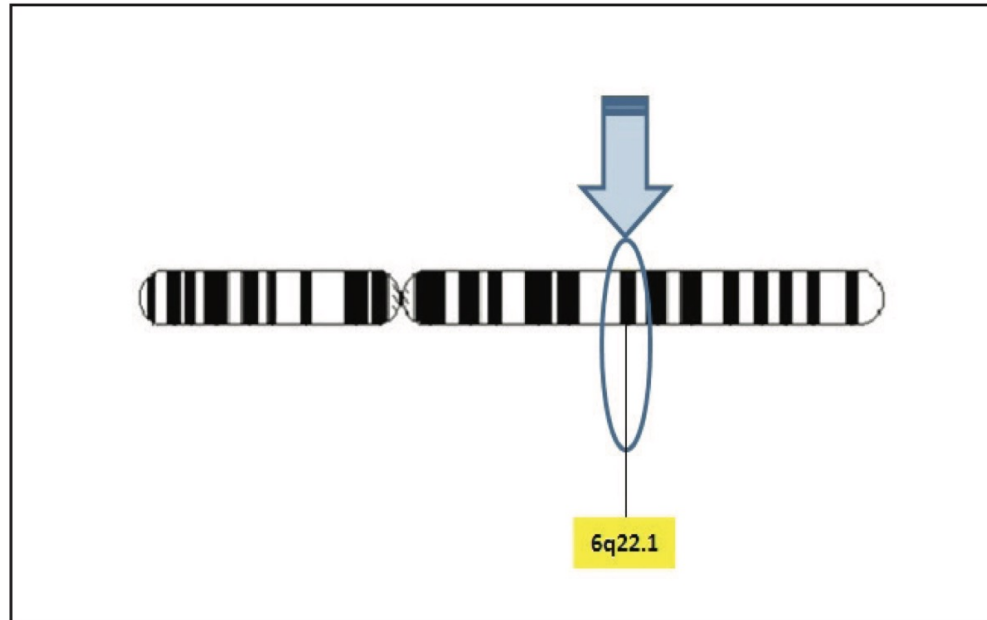


Figura 19. Localizzazione gene di ROS 1.

I riarrangiamenti di tale gene, codificando per una proteina implicata nell'attivazione del pathway di crescita e proliferazione cellulare (nei pathway di PI3K / AKT / mTOR, JAK / STAT e MAPK / ERK) sono responsabili del < 5% dei NSCLC.

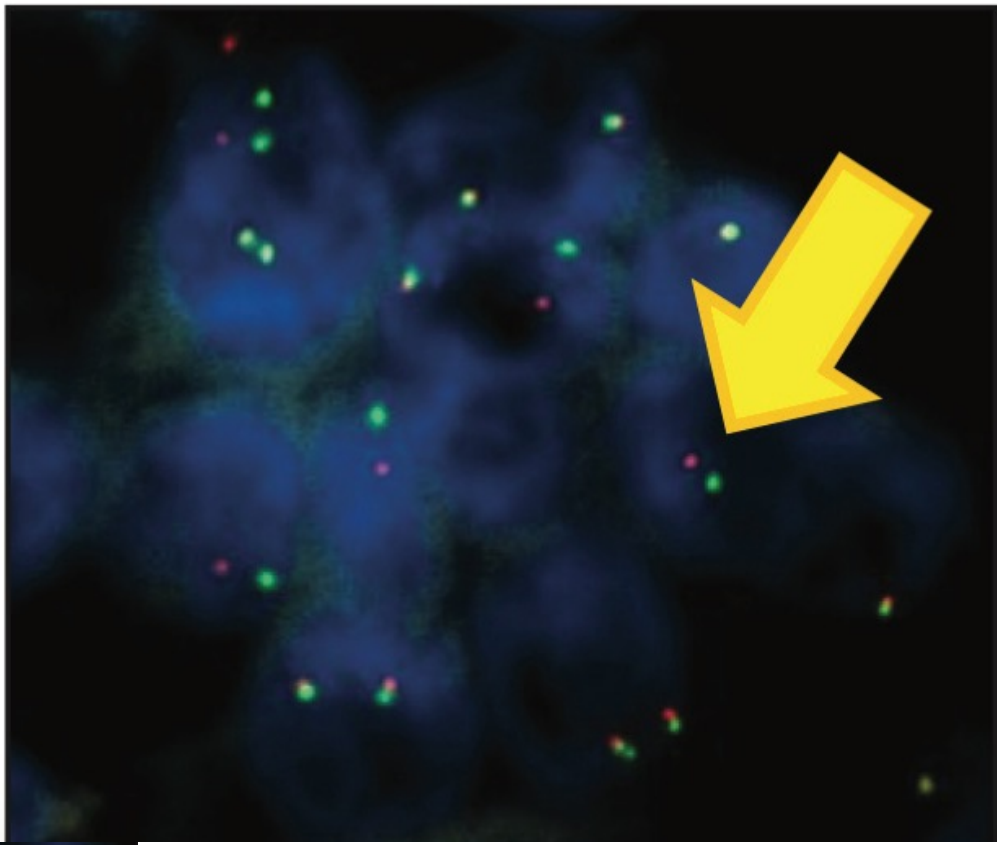
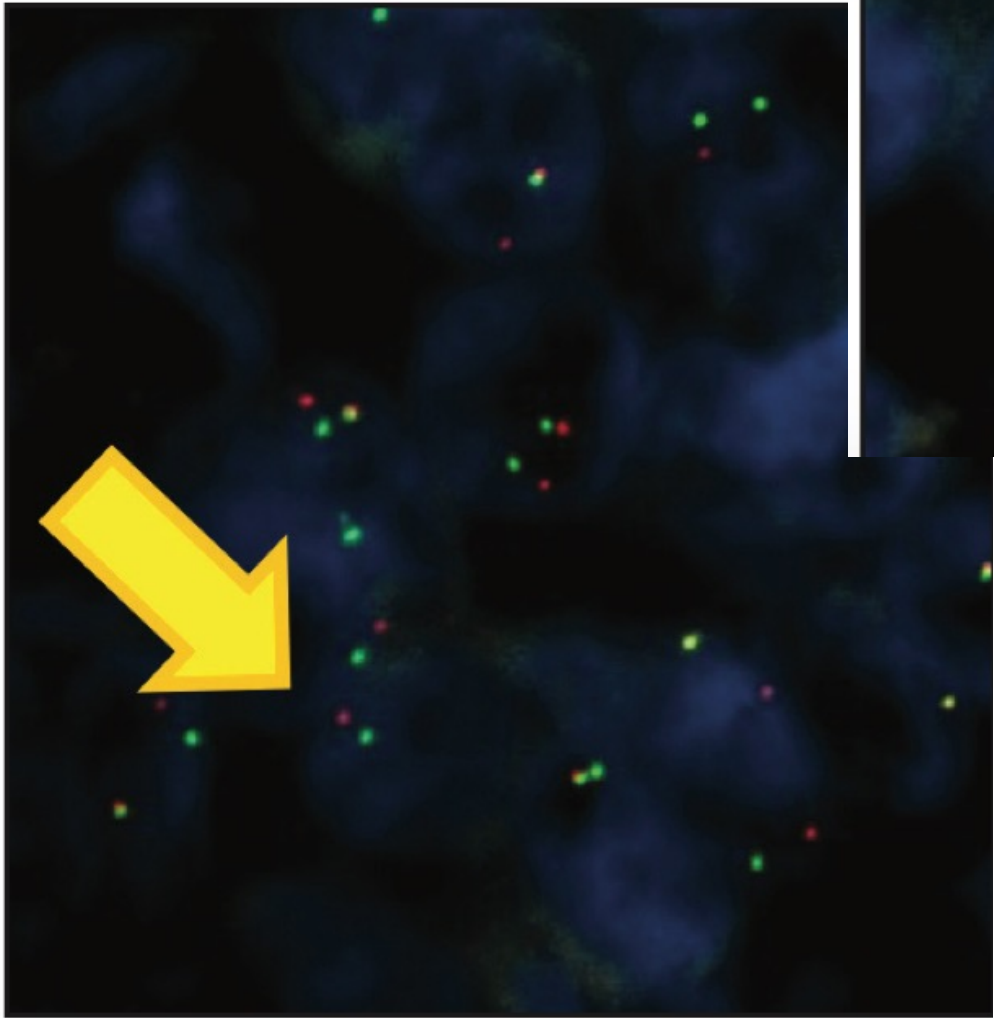
I pazienti ROS1 positivi possono beneficiare della stessa categoria di farmaci adoperata contro i tumori [ALK positivi](#).

La sonda ROS1 Dual Color Break Apart

Sonda ROS1 Dual Color Break Apart visualizzando la traslocazione 6q22, con filtri appropriati, produce segnale arancio e verde nelle zone di ibridazione della regione cromosomica 6q22.

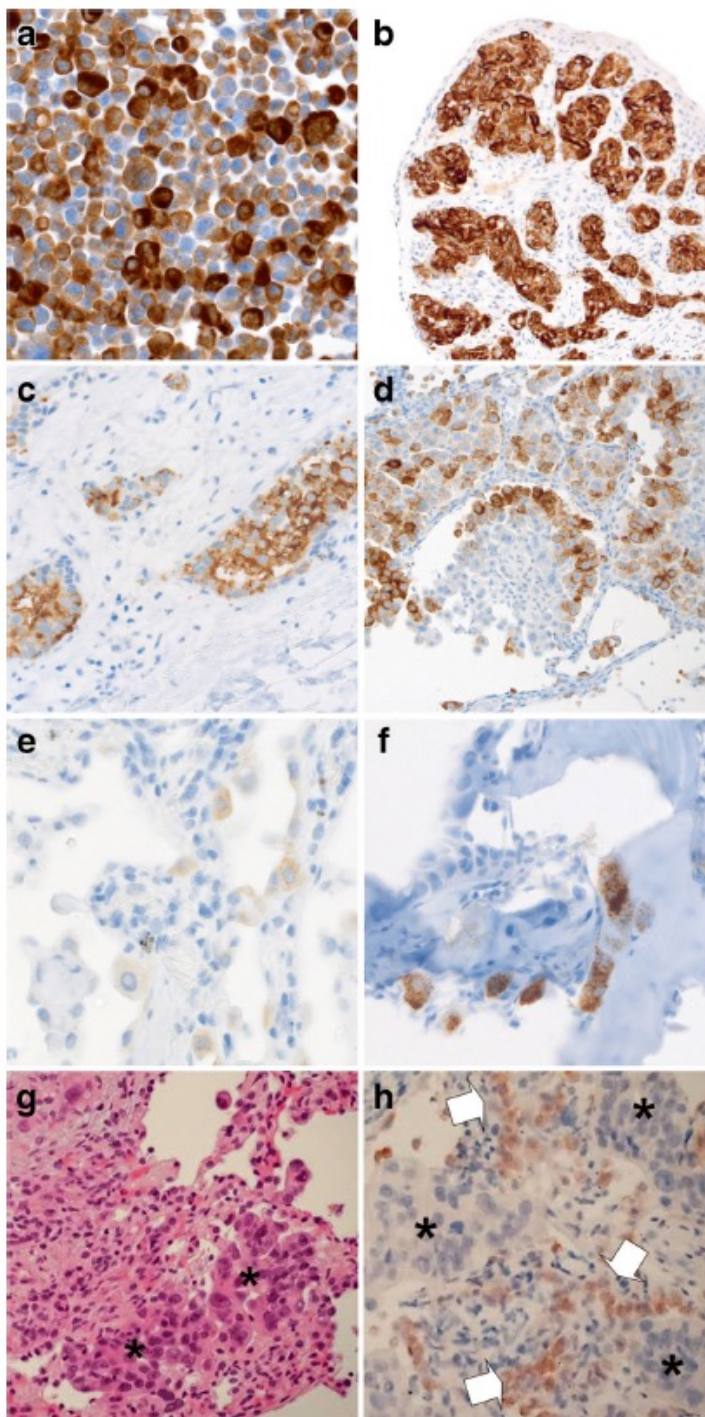
Le cellule interfase normali o le cellule senza traslocazione 6q22 producono due segnali di fusione arancio/verde non separati

Nelle regioni in cui c'è la traslocazione 6q22, si osservano un segnale verde ed un segnale arancione, separati uno dall'altro.



Per la FISH è previsto un *cut-off* del 15% di cellule neoplastiche riarrangiate per considerare il tumore positivo.

In IHC è possibile utilizzare diversi anticorpi anti-ROS1, tra cui D4D6 (Cell Signaling Technology) e SP384 (Ventana).



La metodologia del test prevede l'immunoistochimica e la fluorescenza con ibridazione in situ (FISH).

a–f Examples of ROS1 IHC in histological NSCLC specimens (D4D6 antibody, Ventana BenchMark XT; DAB chromogen).

g–h Aberran immunostaining of ROS1 in a transbronchial biopsy with lung adenocarcinoma. **g** H&E stain, asterisks show tumour cells. **h** ROS1 IHC in adjacent hyperplastic type II pneumocytes (arrows) but not in tumour cells (asterisks)

Only 5 of these targets have agents through approval by the FDA and EMA

- **EGFR mutation**
- **ALK rearrangement**
- **ROS1 rearrangement**
- **BRAF mutation**
- **NTRK rearrangement**

Addictive oncogenic drivers make excellent drug targets and excellent biomarkers

EMA, European Medicines Agency; FDA, Food and Drug Administration.

1. Data from Tsao, et al. *J Thorac Oncol* 2016;11:613; 2. Sun et al. *J Clin Oncol* 2010;28:4616; 3. Odogwu, et al. *Oncologist* 2018;23:740; FDA website: <https://bit.ly/2TDORX1>. Accessed September 2020.

'Driver' mutations and lung adenocarcinoma biology



Oncogene
'Addiction'

Genetically simple tumours
NO tobacco carcinogenesis
Mutually exclusive drivers
Almost exclusively adenocarcinomas



Oncogene
'Expeditious'

Genetically complex tumours
Tobacco carcinogenesis
Multiple drivers incl loss of TSG
Many adenocarcinomas, vast majority of squamous and SCLC

CODICE OPIS

NS03L7N8