

**ALMA MATER STUDIORUM-UNIVERSITA' DI BOLOGNA**

**SCUOLA DI FARMACIA, BIOTECNOLOGIE E SCIENZE  
MOTORIE**

**CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE**

**Correlazione fra la percentuale di cellule neoplastiche mutate in  
EGFR e la risposta a farmaci inibitori delle tirosin-chinasi negli  
adenocarcinomi del polmone**

---

**Presentata da:**  
Thomas Brand

**Matricola n°**  
0000699070

**Relatore:**  
Prof.ssa Annalisa Pession

**Correlatore**  
Dott. Dario de Biase

**Anno accademico 2015/16**



# **1.INTRODUZIONE**

## **1.1 I tumori polmonari**

I polmoni sono una coppia di organi asimmetrici posti nella cavità toracica, la cui funzione è di permettere lo scambio gassoso fra sangue ed atmosfera, mediante la ventilazione. Lo scambio gassoso avviene a livello degli alveoli. Nel polmone possono insorgere numerosi tipi di tumori, la maggior parte dei quali è di natura epiteliale (99% dei casi sono carcinomi). I tumori polmonari sono molto spesso letali: costituiscono difatti il 30% della mortalità associata a tumore, con un picco di incidenza attorno a 60 anni (età di insorgenza compresa fra 40-70 anni). La loro letalità è anche legata al fatto che spesso vengono diagnosticati quando hanno già raggiunto uno stadio avanzato. Il tumore polmonare presenta sintomi generali, come tosse cronica, stanchezza e dimagrimento, manifestazioni cliniche che non sono univocamente indici di un tumore polmonare. Questa sintomatologia generica fa sì che, in molti casi, si manifesti prima la metastasi che il tumore primitivo, il che rende la neoplasia spesso già inoperabile. La difficoltà nell'effettuare una diagnosi precoce è anche dovuta alla difficile analisi eco-endoscopica del polmone: la componente centrale è esplorabile mediante broncoscopia e successiva analisi citologica dell'escreato (muco) bronchiale; le regioni periferiche possono essere esplorate tramite TAC (tomografia assiale computerizzata). Purtroppo, nessuna di queste tecniche è utilizzabile per controlli di screening, in quanto invasive per il paziente, costose o potenzialmente rischiose. Il carcinoma polmonare può metastatizzare a tutti gli organi, ma soprattutto al cervello, ghiandole surrenali e ossa. L'insorgenza del carcinoma polmonare è facilitata dalla presenza di cicatrici, dovute a precedenti fenomeni necrotici (polmoniti o infezioni) nel parenchima polmonare.

### Classificazione dei carcinomi polmonari

Da un punto di vista istologico, i carcinomi polmonari si distinguono in:

Small Cell Lung Cancer (SCLC): chiamato anche microcitoma e costituisce circa il 17% dei tumori polmonari. È un carcinoma di alto grado che insorge dalle cellule di Kulchinsky, poste nello strato basale dell'epitelio bronchiale ed è quindi un tumore "centrale" (si trova al centro della struttura polmonare). Il SCLC è un tumore ad altissimo tasso proliferativo, il che ne permette una rapida diffusione: il SCLC, piuttosto che espandersi *in situ*, tende a metastatizzare per via ematica e linfatica. Abitualmente, il microcitoma non viene operato e non vi sono, ad oggi, farmaci specifici. Il trattamento convenzionale prevede cicli di chemioterapia, non a scopo curativo, ma palliativo.

Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): costituisce circa l'80% dei tumori polmonari. È ulteriormente classificato in i) adenocarcinoma o ii) carcinoma squamoso. L'adenocarcinoma è un tumore solitamente periferico, che origina dalla componente alveolare del polmone, con differenziamento ghiandolare. È un tumore tipico dei non fumatori ed è il più frequente istotipo NSCLC (circa il 40% dei casi). Il carcinoma squamoso origina nell'epitelio bronchiale ma, a differenza del microcitoma, insorge dallo strato più esterno dell'epitelio, in seguito ad una precedente displasia da epitelio cilindrico monostratificato ciliato ad un epitelio pavimentoso pluristratificato (causato, per esempio, dal fumo).

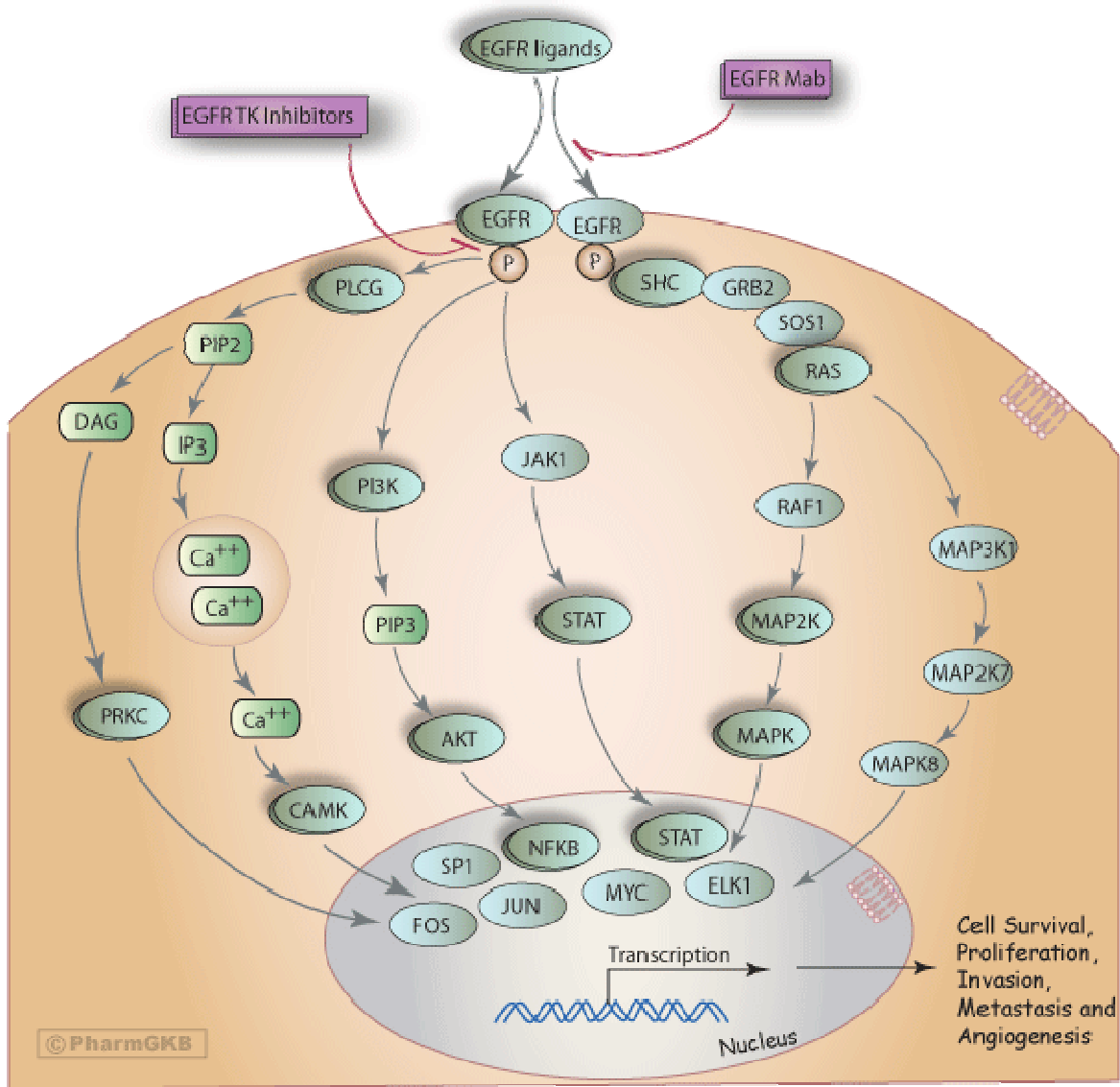
## **1.2 Diagnostica molecolare degli adenocarcinomi del polmone**

Per quanto riguarda la tipizzazione molecolare, l'adenocarcinoma è l'istotipo con maggiori markers diagnostici e terapeutici a disposizione. Le analisi solitamente utilizzate sono la ricerca mutazionale nei geni EGFR e KRAS e lo studio dei riarrangiamenti cromosomici di ALK e ROS1 (valutati principalmente mediante FISH – fluorescence in situ hybridization).

### EGFR e KRAS

È stato osservato che mutazioni nel gene EGFR (negli esoni 18, 19, 20 o 21) possono conferire al paziente sia sensibilità ai farmaci TKI (inibitori delle tirosin-chinasi),

cheresisitenza, a seconda del tipo di mutazione. L'analisi molecolare di EGFR è quindi indispensabile per il trattamento con EGFR-TKI (es. Gefitinib), i quali offrono una prognosi ed una qualità di vita migliore rispetto alla tradizionale chemioterapia con cis-platino. Le mutazioni che più frequentemente conferiscono sensibilità al trattamento sono delezioni a livello dell'esone 19 (es. p.E746-A745delELREA) o una mutazione a livello del codone 851 dell'esone 21 (p.L851R, c.2573T>G). Al contrario, è stato osservato che inserzioni nell'esone 20 o la mutazione p.T790M (c.2573T>G) sono associate ad una resistenza al trattamento. Mutazioni a livello degli esoni 2 e 3 di KRAS causano una perdita dell'attività GTPasica della proteina, che rimane così attiva. Essendo KRAS a valle nel pathway di segnalazione delle MAPK rispetto ad EGFR (**Fig.1**), se si usassero farmaci anti-EGFR con KRAS attivo costitutivamente, questi non avrebbero effetto in quanto KRAS non è più dipendente dalla stimolazione di EGFR e la via di segnalazione rimarrebbe "accesa". Tuttavia, considerando l'eterogeneità genetica dei tumori, la sola mutazione di KRAS non è sufficiente per escludere il paziente dal trattamento con EGFR-TKI. Difatti, soggetti con un tumore composto da due cloni cellulari, uno mutato in EGFR e uno in KRAS, trarranno comunque giovamento dal trattamento. Tuttavia, anche in presenza di markers di sensibilità ai TKI, la durata della risposta ai farmaci è variabile e nel 25% dei casi il tumore progredisce durante il trattamento. Queste resistenze potrebbero essere causate dalla presenza di altri fattori molecolari non ancora definiti o dall'eterogeneità tumorale (non tutte le cellule neoplastiche sono mutate in EGFR). Per quest'ultimo motivo è importante il poter stimare il tasso di eterogeneità della massa tumorale, per aiutare nel predire la risposta della terapia mirata.



**Fig.1:** Pathway di segnalazione di EGFR. Fonte: [www.pharmgkb.org/pathway/PA162356267](http://www.pharmgkb.org/pathway/PA162356267)

Un precedente lavoro [1] ha evidenziato, riguardo all'adenocarcinoma polmonare, un collegamento fra la percentuale di alleli EGFR mutati (nella massa tumorale) e la risposta al trattamento con TKI. Obiettivo del nostro studio è di indagare se esiste una connessione fra percentuale di cellule neoplastiche mutate in EGFR e la risposta al trattamento con TKI. La percentuale di alleli EGFR mutati è stata valutata mediante NGS (Next Generation Sequencing) 454 e tale percentuale è poi stata normalizzata con la reale quantità di cellule neoplastiche presenti nel tessuto analizzato (questo elimina la contaminazione da parte di cellule normali).

## 2.MATERIALI & METODI

### 2.1 Selezione dei casi

Da una casistica di tumori NSCLC del polmone tipizzati per EGFR, sono stati selezionati 18 casi, scelti secondo i seguenti criteri:

- i) portatori di una o più mutazioni di sensibilità nel gene EGFR
- ii) trattamento in prima linea con farmaci TKI
- iii) disponibilità del follow-up.

La tabella sottostante mostra i casi selezionati. La percentuale di cellule neoplastiche nell'area analizzata è stata valutata da un patologo.

Features	Values	Range/Percentage
Median age (range)	68	(46-86)
<b>Sex</b>		
- Male	5	27.8%
- Female	13	72.2%
<b>Site</b>		
- Lung	16	88.9%
- LN	1	5.6%
- PL	1	5.6%

**Tab.1:** Casi selezionati. LN, Lymph node; PL, Pleural liquid.

### 2.2 Estrazione del DNA

Il materiale di partenza era costituito o da strisci citologici o da materiale fissato in formalina ed incluso in paraffina (FFPE). L'estrazione del DNA dai campioni è stata effettuata usando il kit "MasterPure DNA Purification Kit"(Epicentre) nel caso di strisci citologici e il kit "Quick Extract" (Epicentre) nel caso di campioni paraffinati.

*Striscio citologico:* si rimuove il vetrino coprioggetto dallo striscio immergendo per circa 48h il vetrino in xilolo. Rimosso il vetrino coprioggetto, si gratta, mediante una lama da bisturi, il materiale citologico, trasferendolo in una eppendorf da 1,5mL e si aggiungono quindi 300µL di "Tissue & Cell Lysis Buffer" e 5µL di enzima

“PK”(protein chinasi; questo passaggio serve per rompere le membrane cellulari, facendo uscire il DNA in soluzione). Si lascia ad incubare per almeno 1 ora a 56°C. Terminata l'incubazione, si porta il campione a 4°C (favorisce la precipitazione proteica) e si aggiungono 175µL di “MPC Protein Precipitation Buffer”, per poi centrifugare a freddo (10'000 rpm per 10 minuti; il passaggio serve a far precipitare le proteine). Il DNA, rimasto nel surnatante, viene prelevato e trasferito in una nuova eppendorf, scartando il pellet proteico. Si aggiungono poi 500µL di isopropanolo (per permettere l'aggregazione e la precipitazione del DNA) e si centrifuga (10'000 rpm per 10 minuti). Si scarta il surnatante e si fanno 2 lavaggi con etanolo 75% (con centrifughe a 10'000 rpm per 5 minuti), ogni volta risospendendo il pellet di DNA. Scartato il surnatante dopo il secondo lavaggio, si risospende il DNA in 100µL di TE (TRIS-EDTA) Buffer.

Campioni Paraffinati: usando come guida l'area segnata dal patologo sul vetro colorato con ematossilina/eosina, si gratta, mediante una lama da bisturi, l'area d'interesse. Il materiale viene trasferito in una eppendorf, alla quale si aggiungono circa 100µL di soluzione “Quick Extract” (la precisa quantità varia a seconda della quantità di materiale grattato). L'eppendorf viene poi lasciata a 56°C per almeno 3 ore. Terminata l'incubazione, si incuba l'eppendorf a 98°C per 2 minuti (questo passaggio serve per inattivare la componente enzimatica), per poi centrifugare a 10'000 rpm per 4 minuti. Nella eppendorf si forma così un anello di paraffina, al di sotto del quale si ritrova la fase liquida contenente il DNA estratto. Si preleva quindi tale fase liquida, trasferendola in una nuova eppendorf.

### **2.3 Analisi della mutazione in EGFR tramite NGS**

L'analisi di EGFR è stata effettuata mediante Next Generation Sequencer (NGS) 454-GS Junior (Roche). Si parte amplificando gli esoni 18, 19, 20, 21 del gene EGFR (regioni che, nel caso risultino mutate, conferirebbero sensibilità ai



farmaci TKI, in quanto codificano per la porzione di proteina che compone la tasca di legame per il farmaco). Per amplificare solo queste regioni, si prepara una PCR, usando primer specifici a tali esoni. I primer contengono una sequenza “tail” alla loro estremità 5’. La ricetta ed i cicli di PCR seguiti sono i seguenti (i volumi riportati si riferiscono ad un singolo pozzetto di reazione):

- H<sub>2</sub>O -> 11.2μL
- dNTPs -> 0.4μL
- Buffer HF -> 4μL
- MgCl<sub>2</sub> -> 0.2μL
- Phusion -> 0.2μL
- Primer -> 2μL
- DNA -> 2μL

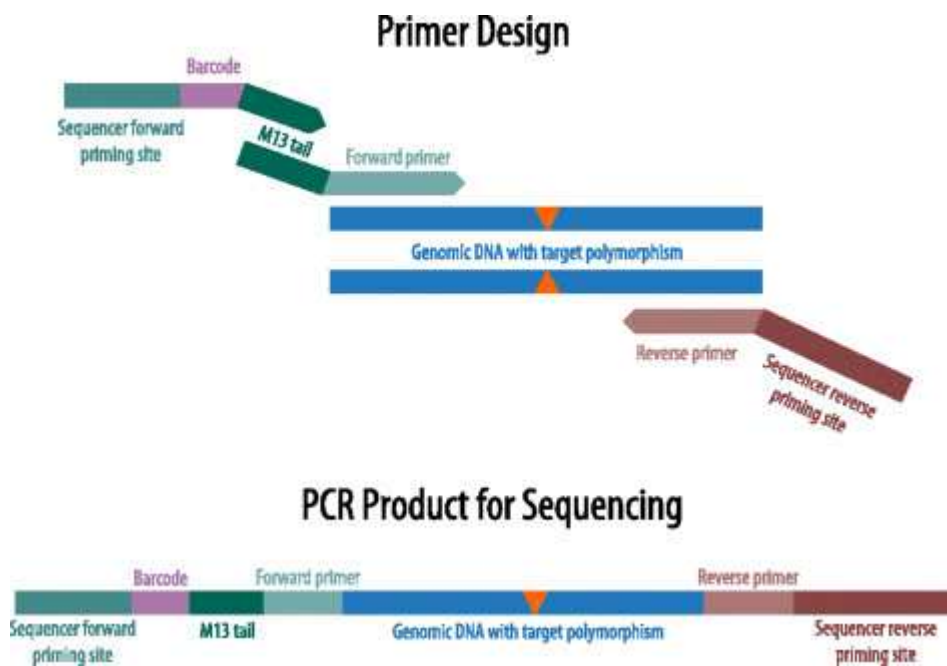
Temperatura	Tempo	Nr.Cicli
98°C	3'	1
98°C	10''	37
60.5°C	20''	
72°C	20''	
72°C	5'	1
20°C	∞	

Questa prima PCR viene poi seguita da una seconda PCR, i cui primer contengono una regione complementare al “tail” dei primer usati per la prima PCR, una regione “mid” (ad ogni campione viene associato un “mid”, in modo da renderlo identificabile dopo il sequenziamento) e una regione “universal” (serve per la procedura di sequenziamento). La ricetta ed i cicli di PCR seguiti

sono i seguenti (i volumi riportati si riferiscono ad un singolo pozzetto di reazione):

- H<sub>2</sub>O -> 11.4μL
- Buffer HF -> 4μL
- dNTPs -> 0.4μL
- Phusion -> 0.2μL
- Primer -> 2μL
- DNA -> 2μL (diluito 2:200)

Temperatura	Tempo	Nr.Cicli
98°C	3'	1
98°C	10''	32
54°C	20''	
72°C	20''	
72°C	5'	1
20°C	∞	



**Fig.2:** L'immagine mostra il prodotto finale delle due PCR e gli elementi che compongono i primer usati.

Per la seconda PCR, il DNA viene diluito 2:200 perchè si tratta di materiale già amplificato. I prodotti della seconda PCR vengono poi purificati mediante delle biglie magnetiche (legano il DNA, che si può quindi separare, assieme alla biglia, dal resto dei reagenti di PCR mediante un magnete); le biglie vengono poi lavate con passaggi in etanolo e il DNA viene eluito dalle biglie mediante buffer TE 1x.

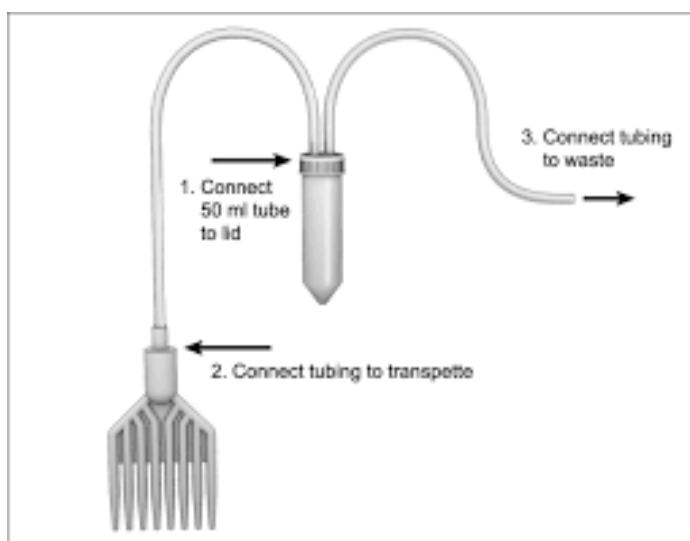
Il DNA purificato viene poi quantificato mediante fluorimetro, utilizzando come intercalante il Pico-Green (Invitrogen). Questo passaggio è importante per determinare la quantità di DNA presente per ciascun campione: nella fase successiva, basandosi sui risultati della quantificazione, bisogna portare tutti i campioni ad una quantità di  $10^9$  molecole di DNA per  $\mu\text{L}$  (in modo da non avere campioni sovra- o sottorappresentati in seguito al sequenziamento).

Terminata la preparazione della libreria di ampliconi, si procede con la fase di "Emulsion PCR" (emPCR –protocollo 454-GS Junior Roche): il DNA (purificato, quantificato e portato a  $10^9$  molecole per  $\mu\text{L}$ ) viene legato a delle

biglie, sulla cui superficie sono legati frammenti di DNA, complementari alla regione “universal”. Dopodichè le biglie vengono incluse nell’olio di emulsione, assieme ai reagenti che costituiscono la mix di emPCR. Si formano delle micelle nell’olio, ognuna contenente una biglia con il DNA legato. La soluzione con le micelle viene poi aliquotata (100µL) nei pozzetti di una piastra, che viene poi messa in PCR per circa 8 ore. I cicli di PCR seguiti sono i seguenti:

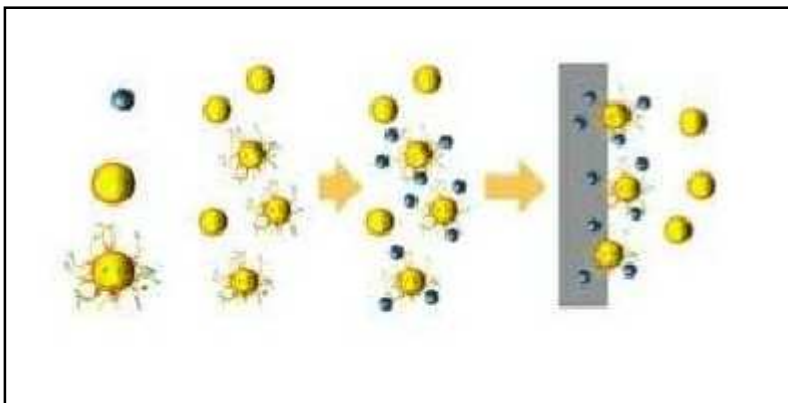
Temperatura	Tempo	Nr.Cicli
94°C	4’	1
94°C	30’’	47
58°C	4’30’’	
68°C	30’’	
10°C	∞	

Terminata la emPCR, si trasferisce tutto il contenuto dei pozzetti in una unica falcon da 50mL mediante l’uso di un pettine (**Fig.3**).



**Fig.3:** Pettine usato per trasferire il prodotto della emPCR

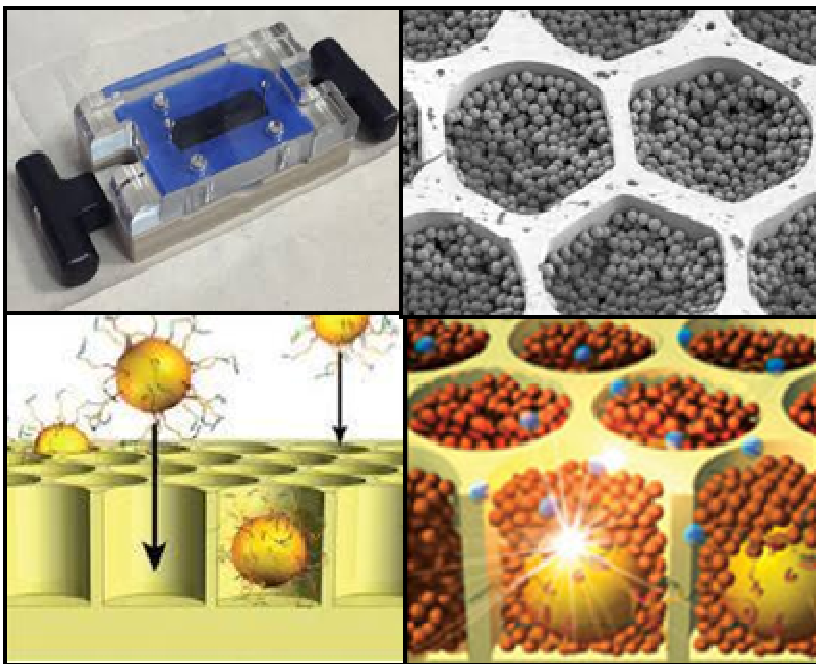
Segue una serie di lavaggi con vari alcoli (isopropanolo ed etanolo) volti a rompere le micelle, permettendo il recupero delle biglie, che adesso sono ricoperte di DNA amplificato. Si aggiunge poi una “melt solution” (contenente NaOH 10N) alle biglie, aprendo le doppie eliche del DNA, per poi aggiungere i primer di enrichment: sono primer complementari alle estremità del DNA legato alle biglie. A loro volta, i primer hanno legata, alla loro estremità, una molecola di biotina. Si aggiungono poi delle biglie magnetiche, con molecole di streptavidina legate alla loro superficie: la streptavidina lega la biotina attaccata ai primer di enrichment. Mediante un magnete sarà così possibile eliminare le biglie scariche e trattenere solo quelle cariche di DNA: il magnete trattiene le biglie magnetiche, attaccate alla streptavidina, legata alla biotina, attaccata al primer di enrichment, legato al DNA sulla biglia carica.



**Fig.4:** Isolamento delle biglie cariche mediante un magnete

Eliminate le biglie scariche si effettuano una serie di lavaggi con buffer salini ed un passaggio in NaOH, per staccare le biglie cariche dai primer di enrichment. Isolate le biglie cariche, si aggiungono i primer di sequenziamento. Il sequenziamento consiste nell'aggiungere le biglie cariche ad un chip contenente centinaia di migliaia di pozzetti. Oltre alla biglia carica, ogni pozzetto contiene enzyme beads, PPase beads (rendono la lettura del segnale più pulita, eliminando il pirofosfato in eccesso) e le packing beads (fanno aderire il tutto).

Il sequenziamento usato dal 454-GS Junior è un pyrosequencing: la macchina aggiunge i 4 nucleotidi (una alla volta, in modo ciclico) ai pozzetti; se il nucleotide si appaia al DNA sulla biglia, esso viene incluso nel filamento nascente (che parte dal primer di sequenziamento) e viene rilasciato PPI (pirofosfato). Il PPI viene trasformato in ATP dall'enzima sulforasi e l'ATP viene poi trasformata, dall'enzima luciferasi, in luciferina e luce. La luce viene letta dallo strumento, che quindi rileva l'inserimento del nucleotide nel filamento; il sequenziatore rileva la quantità di nucleotidi dello stesso tipo inclusi uno dopo l'altro misurando l'intensità della luce prodotta.



**Fig.5:** Immagine del chip di sequenziamento (alto a sinistra), immagine dei pozzetti del chip al microscopio elettronico a scansione (alto a destra) e rappresentazioni grafiche del packing delle biglie (basso).

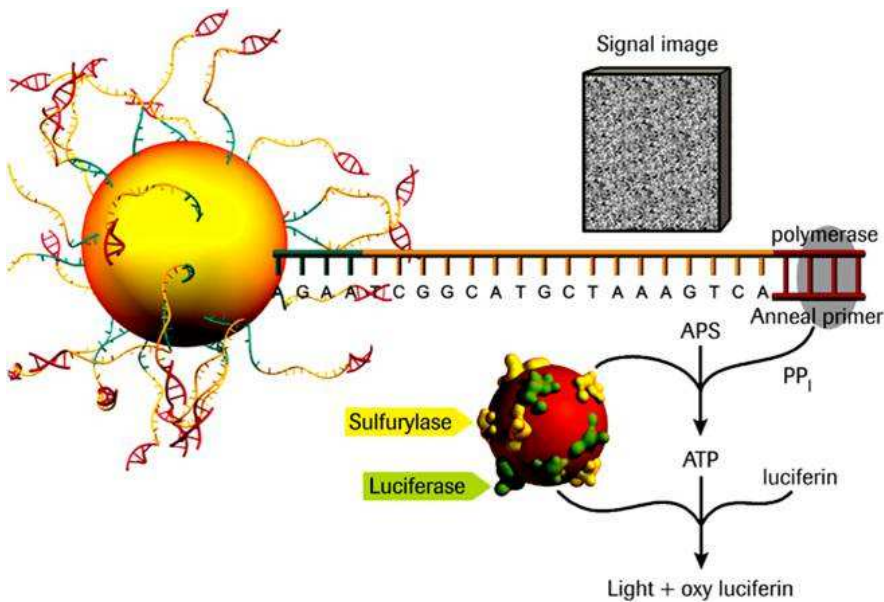


Fig.6: Immagine del processo di sequenziamento

## 2.4 Analisi dei risultati

I dati ottenuti dal sequenziamento vengono analizzati da un'applicazione chiamata "GS Amplicon Variant Analyzer" (AVA), che allinea le reads ottenute dal sequenziamento con una sequenza di riferimento (**Fig.7**). Le variazioni della sequenza sono identificate e visualizzate sia graficamente, sia testualmente con un allineamento multiplo codice-colore evidenziando le regioni e le basi di differenza con la sequenza di riferimento. Il software, inoltre, segnala la frequenza delle variazioni dei singoli campioni.

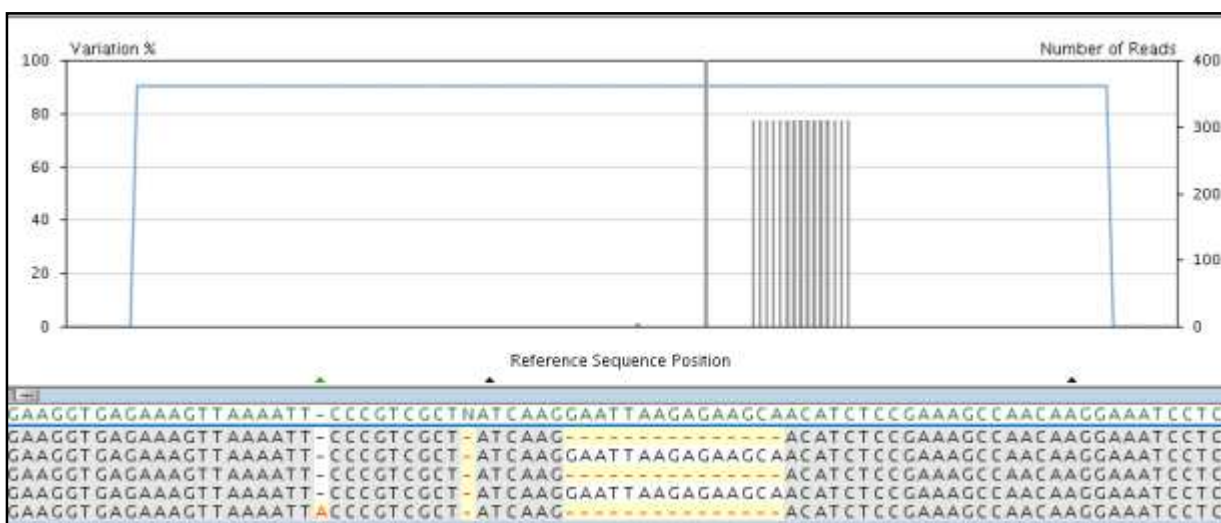


Fig.7: Immagine di una delezione nell'esone 19 di EGFR

## 2.5 Determinazione della percentuale di cellule neoplastiche mutate

La percentuale di alleli mutati ottenuta mediante NGS è stata normalizzata alla proporzione di cellule neoplastiche in ciascun tumore usando la seguente formula [2]

:

$$\text{Percentuale di cellule neoplastiche mutate} = [(MR * 2)/X] * 100$$

MR rappresenta la percentuale di reads mutate ottenute mediante NGS e X rappresenta la percentuale di cellule neoplastiche. Tutti i casi di mutazioni in EGFR sono state considerate come eterozigoti, perciò “MR \* 2” rappresenta il numero di cellule mutate in EGFR.

## 3.RISULTATI

Nei 18 casi analizzati sono state trovate, in totale, 20 mutazioni nel gene EGFR:

Features	Values	Range/Percentage
<b>EGFR mutation*</b>		
- DEL E746-A750	5	27.8%
- DEL L747-P753	2	11.1%
- DEL L747-749 + K745E	2	11.1%
- DEL E746-T751	1	5.6%
- DEL E746-S752	1	5.6%
- DEL L747-A750	1	5.6%
- DEL L747-E749	1	5.6%
- L858R	3	16.7%
- E709A/G719A*	1	5.6%
- G719S/L861Q*	1	5.6%
<b>EGFR Exon</b>		
- 18/18*	1	5.6%
- 18/21*	1	5.6%
- 19	13	72.2%
- 21	3	16.7%
Median % mutated alleles (range)	21	(4-70)
Median % EGFR mutated cells (range)	85	(15-100)
<b>Response to treatment</b>		
- Progression Disease	4	22.2%
- Stable Disease	6	33.3%
- Partial Response	8	44.4%
- Complete Response	0	0.0%



#	Sex	Age	% neoplastic cells in analyzed area	EGFR Mutation	Exon	Clinical significante of Mutation	% mutated alleles	% EGFR mutated cells	Response to treatment
1	M	47	70	E709A	18	PR	32	91.4	PD
				G719A	18	R	32	91.4	
2	F	69	20	G719S	18	R	4	40.0	SD
				L861Q	21	R	3	30.0	
3	M	63	30	DEL E746-A750	19	R	22	>100	PR
4	F	46	40	DEL E746-A750	19	R	11	55.0	SD
5	M	81	60	DEL E746-A750	19	R	7	23.3	SD
6	F	82	50	DEL E746-A750	19	R	57	>100	SD
7	F	74	60	DEL E746-A750	19	R	23	76.7	PR
8	F	68	50	DEL E746-S752	19	R	20	80.0	PR
9	F	67	40	DEL E746-T751	19	R	20	100.0	PR
10	F	83	65	DEL L747-E749 + K745E	19	R	5	15.4	PD
11	F	82	50	DEL L747-A750	19	R	14	56.0	PD
12	M	54	30	DEL L747-E749	19	R	70	>100	PR
13	F	60	60	DEL L747-E749 + K754E	19	R	53	>100	SD
14	M	58	60	DEL L747-P753	19	R	30	100.0	PR
15	F	86	70	DEL L747-P753	19	R	54	>100	PR
16	F	71	40	L858R	21	R	6	30.0	PR
17	F	76	50	L858R	21	R	13	52.0	SD
18	F	64	50	L858R	21	R	32	>100	PD

\* In due pazienti sono state rilevate due mutazioni in EGFR

In alcuni casi sono state rilevate percentuali di cellule mutate in EGFR superiori al 100%. Questi dati potrebbero dipendere dal fatto che la percentuale di cellule neoplastiche considerata rappresenta solo una stima del reale contenuto neoplastico del tumore; la percentuale di cellule neoplastiche potrebbe inoltre essere influenzata dalla presenza di cellule morfologicamente normali, ma comunque mutate in EGFR. Di queste mutazioni, 13 sono delezioni nell'esone 19, 3 sono mutazioni p.L858R (esone 21), 2 sono mutazioni p.G719X (esone 18), 1 è una mutazione p.E709A

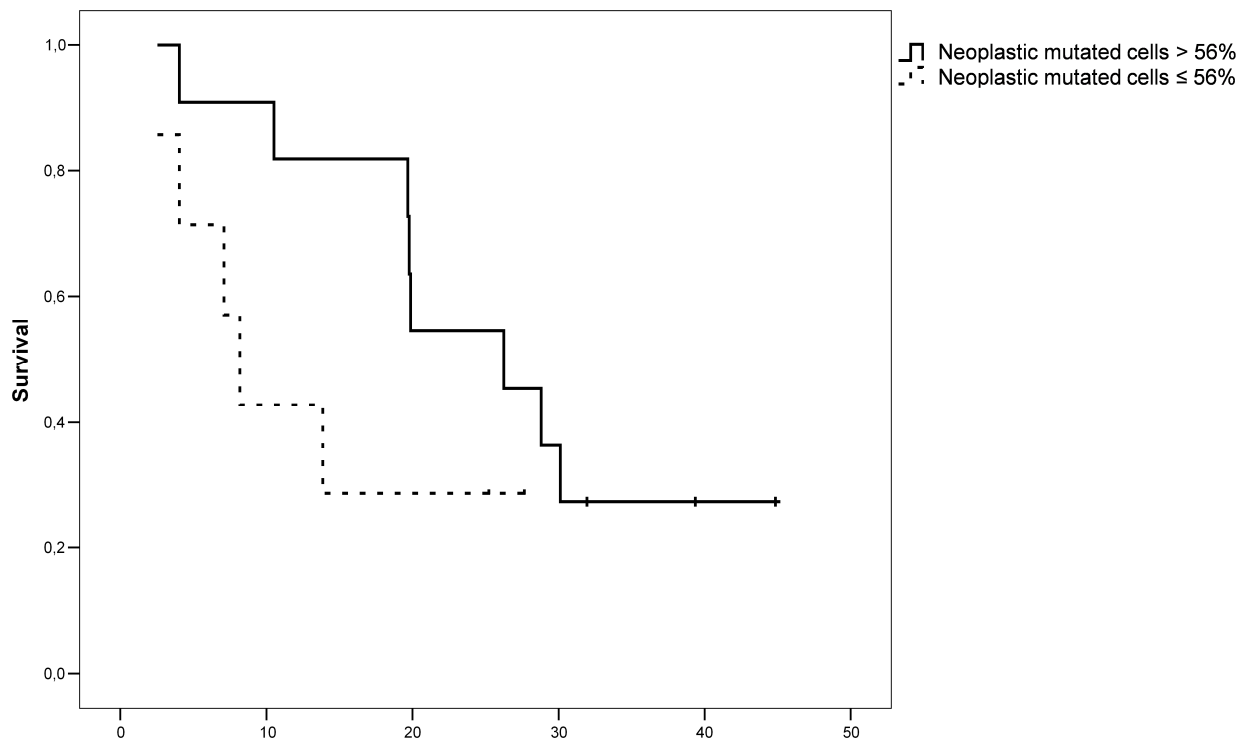
(esone 18) ed 1 è una mutazione p.L861Q (esone 21). La media di reads analizzate per ogni caso è pari a 832 (con un range da 385 a 1'274 reads), la media delle percentuali di cellule neoplastiche presenti nell'area analizzata per ciascun campione è pari a 49.7% (con un range da 20 a 70%) e la mediana di alleli mutati è pari a 21% (da 4 a 70%). Due casi presentano due mutazioni contemporanee in EGFR ed in 6 campioni la percentuale di cellule mutate risulta essere superiore al 100%.

La risposta ai farmaci TKI è stata classificata in due modi:

1. “Sì/No”: si classificano i casi sulla base di presenza di risposta (“Sì”) o della sua assenza (“No”), senza considerare la qualità della risposta. Non vi è una correlazione statistica ( $P=0.313$ ) fra questa classificazione e la percentuale di alleli mutati.
2. “SD/PD/PR”: si classificano i casi in base alla stabilità della patologia (“SD”: stable disease), alla progressione della patologia (“PD”: progressive disease) o alla risposta parziale (“PR”: partial response). Non si sono rilevate risposte totali all'interno dei 18 casi analizzati. Usando questa classificazione, si trova un trend statistico ( $P=0.068$ ) fra risposta al farmaco e percentuale di alleli mutati.

Tuttavia, considerando non la percentuale di alleli mutati, ma la percentuale di cellule neoplastiche mutate, si trova una vera e propria correlazione statistica ( $P=0.005$ ) con la risposta ai farmaci TKI secondo la classificazione “SD/PD/PR” ed un trend ( $P=0.096$ ) con la risposta ai TKI secondo la classificazione “Sì/No”.

Mediante analisi statistiche è stata stabilita una percentuale (di cellule neoplastiche mutate) “cut-off” al di sopra della quale è più probabile avere una risposta “PR”, piuttosto che una “PD” o “SD”:



**Fig.8:** Grafico Kaplan-Meyer che evidenzia il cut-off. Sull'asse delle ascisse è riportato il tempo, espresso in mesi.

Dalle curve di Kaplan-Meyer è possibile osservare come pazienti con una percentuale di cellule mutate in EGFR superiore al 56% abbiano una “overall survival” superiore a quelli con percentuale di cellule mutate in EGFR inferiore al 56% (26,3 mesi vs 8,2 mesi;  $p=0.081$ ).

Le analisi statistiche usate comprendono la correlazione di Spearman, il test di Kruskal-Wallis ed il test di Breslow-Wilcoxon. Il cut-off è stato calcolato secondo il metodo di massimizzazione dell'indice di Youden.

#### 4.Discussione

EGFR è un marcatore molecolare chiave per determinare se trattare un paziente affetto da NSCLC con farmaci EGFR-TKI o meno: la presenza di una mutazione in EGFR conferente sensibilità è, ad oggi, sufficiente per arruolare un paziente in protocolli di trattamento con farmaci TKI. È già stato dimostrato [1-4] che un tumore può presentare eterogeneità molecolare ed è stato ipotizzato[1] che la percentuale di

alleli EGFR mutati correlati con la risposta al trattamento con farmaci TKI. È tuttavia da considerare che la valutazione della percentuale di alleli EGFR mutati può essere influenzata dalla presenza di cellule non-neoplastiche nell'area analizzata (infiltrazione linfocitaria, cellule del tessuto normale...). I nostri dati indicano che non vi è una correlazione statistica fra la percentuale di alleli EGFR mutati e la risposta ai farmaci TKI classificata come “Sì/No”, mentre si osserva un trend statistico ( $P=0.068$ ) fra la percentuale di alleli EGFR mutati e la risposta ai farmaci TKI classificata come “SD/PD/PR”.

Tuttavia, considerando non la sola percentuale di alleli EGFR mutati, ma anche la percentuale di cellule neoplastiche mutate in EGFR, si osserva non solo un trend statistico ( $P=0.096$ ) con la risposta ai farmaci classificata come “Sì/No”, ma anche una correlazione statistica significativa ( $P=0.005$ ) con la risposta classificata come “SD/PD/PR”. Abbiamo inoltre identificato un valore limite (56%) di cellule neoplastiche mutate in EGFR che permette di distinguere pazienti con una migliore probabilità di sopravvivenza.

La casistica qui riportata comprende un numero limitato di casi, tuttavia i dati suggeriscono che oltre al valore predittivo, la definizione della percentuale di cellule mutate in EGFR potrebbe avere un valore prognostico.

## **Ringraziamenti**

Ringrazio la Prof.ssa Annalisa Pession, il Dott. Dario De Biase, la Dott.ssa Michela Visani e la Dott.ssa Giorgia Acquaviva per tutto l'aiuto e gli insegnamenti offerti durante il periodo di tirocinio.

## **Bibliografia**

1. Bria E, Pilotto S, et al. Molecular heterogeneity assessment by next-generation sequencing and response to gefitinib of EGFR mutant advanced lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2015 May 20;6(14):12783-95
2. De Biase D, Cesari V, et al. High-sensitivity BRAF mutation analysis: BRAF V600E is acquired early during tumor development but is heterogeneously distributed in a subset of papillary thyroid carcinomas. *J ClinEndocrinolMetab*. 2014 Aug;99(8):E1530-8
3. Mafficini A, et al. Reporting tumor molecular heterogeneity in histopathological diagnosis. *PLoS One*. 2014 Aug 15;9(8):e104979
4. Yachida S, Jones S, et al. Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature*. 2010; 467:1114-17