



UNIVERSITÀ DI FOGGIA

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

Corso di Dottorato di Ricerca

“Scienze e tecnologie innovative per la salute”

XXXVII Ciclo

Tesi di Dottorato

Caratterizzazione epidemiologica, clinica e molecolare “real life” del tumore polmonare early-stage con mutazioni dei geni EGFR e KRAS in pazienti del Sud Italia

Tutor

Prof. Donato Lacedonia

Dottorando

Dott. Michele Piazzolla

Supervisor

Dott.ssa Muscarella Lucia Anna

A. A. 2023-2024

Indice

1. Introduzione	Pag. 1
• Epidemiologia del tumore polmonare	Pag. 1
• Cenni di eziopatogenesi dei tumori polmonari	Pag. 5
• Classificazione istologica dei tumori polmonari ...	Pag. 8
• Diagnosi e stadiazione dei tumori polmonari	Pag. 11
• Aspetti molecolari nel Tumore del Polmone	Pag. 14
• Strategie terapeutiche nei NSCLC	Pag. 16
1. La Terapia a bersaglio molecolare nei NSCLC: Approfondimenti	Pag. 18
2. Le mutazioni dei geni EGFR e significato clinico ...	Pag. 20
3. Le mutazioni del gene KRAS e significato clinico ...	Pag. 23
2. Scopo della TesiPag. 29
3. Materiali e Metodi	Pag. 30
• Popolazione dello studio e parametri clinico-patologici	Pag. 30
• Raccolta dei campioni biologici	Pag. 31
• Analisi molecolare	Pag. 31
1. Estrazione del DNA	Pag. 31
2. Analisi qualitativa e quantitativa del DNA	Pag. 32
3. Analisi di mutazione dei geni KRAS e EGFR	Pag. 33
1. Analisi del DNA mediante analisi di Next-Generation Sequencing (NGS)	Pag. 34
2. Analisi del DNA mediante Droplet Digital PCR....	Pag. 37
3. Analisi del DNA mediante Pirosequenziamento	Pag. 39
• Analisi statistica.....	Pag. 42
4. Risultati	Pag. 43
5. Discussione	Pag. 60
6. Bibliografia	Pag. 64
7. Ringraziamenti	Pag. 74

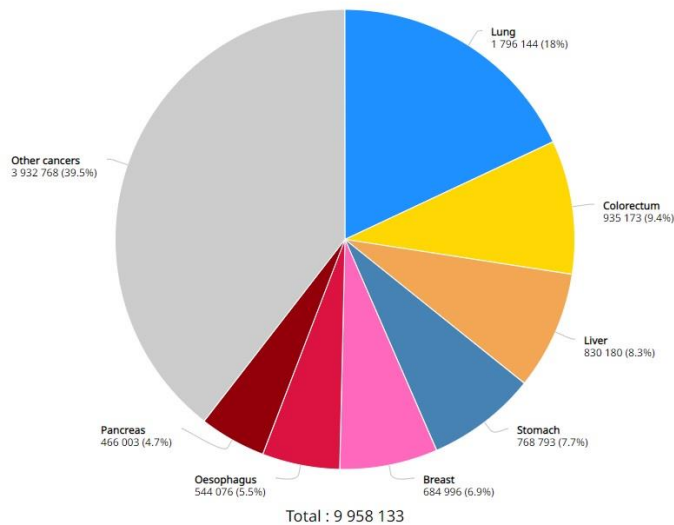
CAPITOLO I

INTRODUZIONE

1. EPIDEMIOLOGIA DEL TUMORE POLMONARE

Nel Mondo si registrano all'incirca 2.200.000 casi di carcinomi polmonari con un numero di decessi pari a 1.790.000, che fanno del tumore al polmone il “*big killer*”, ossia la principale causa di morte per tumore in tutto il Mondo (**Figura 1**)¹. Molto interessante è il dato relativo all'incidenza del tumore polmone, che risulta di gran lunga maggiore nei Continenti con un alto indice di sviluppo umano, HDI (Human Development Index), se comparato con quelli in via di sviluppo, ad esempio Africa, Asia centro-meridionale e Centro America, oltre ad una prevalenza stimata a 5 anni di circa 2 milioni di casi nel Mondo, per ogni fascia di età considerata.

A) Estimated number of deaths in 2020, World, both sexes, all ages



B) Estimated number of new cases in 2020, World, both sexes, all ages

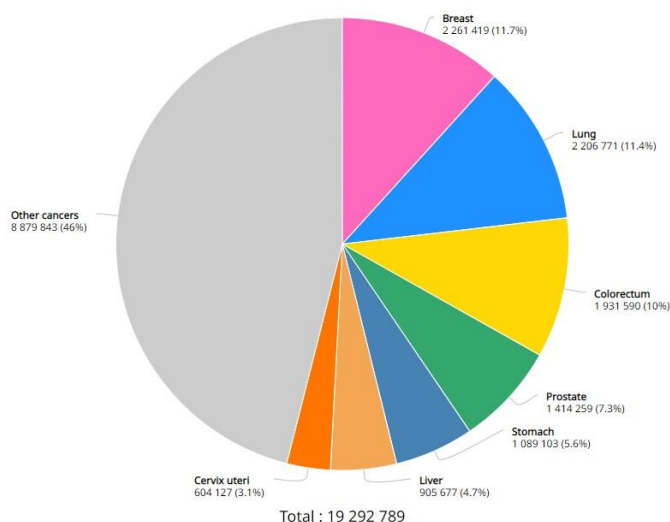


Figura 1. Grafico a torta rappresentativo del tasso di mortalità (A) e incidenza (B) nel Mondo nel 2020 per entrambi i sessi ed in tutte le fasce di età per le diverse tipologie di cancro (<https://gco.iarc.fr>).

Da un punto di vista epidemiologico, i Paesi che hanno un indice di rischio del tumore al polmone più alto sono: Polinesia, Micronesia, Asia Orientale, Europa Occidentale, Nord America ecc. (**Figura 2**).

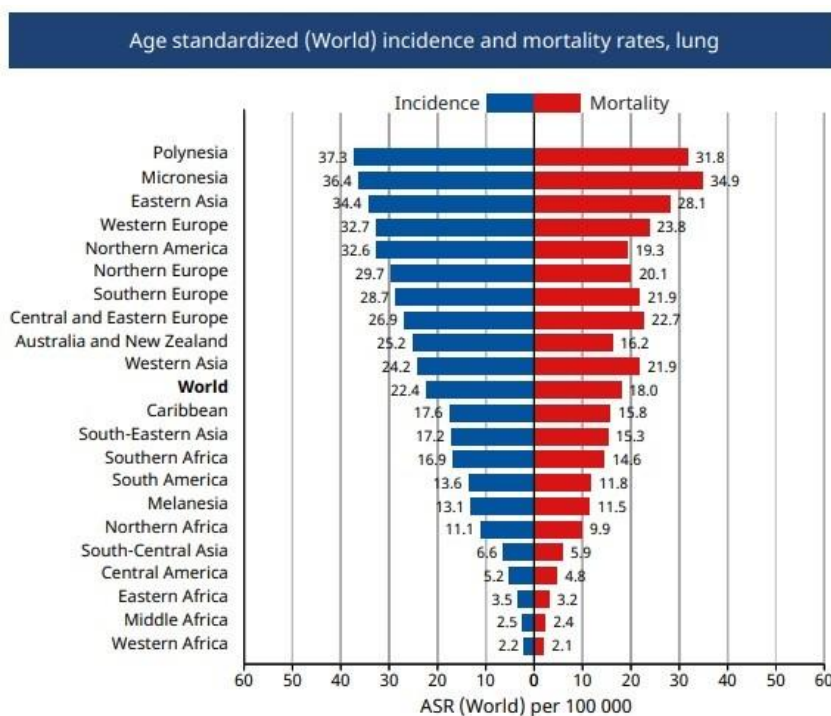
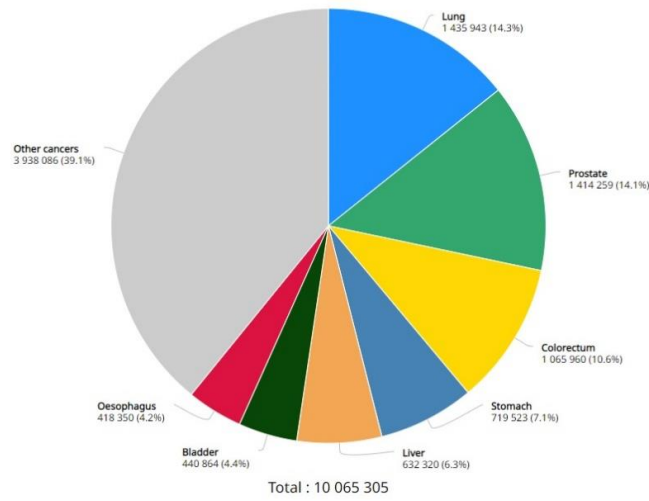


Figura 2. Grafico a barre che riporta la rappresentazione del tasso standardizzato per età di incidenza e di mortalità per tumore al polmone, suddiviso in base alle diverse aree geografiche nel Mondo (anno 2020, <https://gco.iarc.fr>).

Segnali positivi provengono dalle campagne capillari di prevenzione adottate per contrastare le abitudini al fumo, il principale agente eziologico correlato al cancro del polmone, largamente diffuse nei vari Paesi dell'Europa Occidentale: infatti, stanno avendo un notevole riscontro sull'abbattimento dei tassi di incidenza del carcinoma polmonare nei soggetti di sesso maschile ². Allo stesso tempo, occorre monitorare il numero di nuove diagnosi di tumore polmonare registrate nei soggetti di sesso maschile, benché risultano il doppio di quelle di sesso femminile, a conferma del fatto che il consumo di tabacco sia ancora prevalente negli uomini ³. Come mostrato in **Figura 3**, il tumore al polmone occupa il terzo posto tra le neoplasie più frequenti nelle donne dopo il tumore della mammella e il tumore del colon-retto. Il suo *trend* in aumento tuttavia è davvero preoccupante in quanto potrebbe arrivare presto a superare il tumore della mammella in diversi Paesi ².

A) Estimated number of new cases in 2020, World, males, all ages



B) Estimated number of new cases in 2020, World, females, all ages

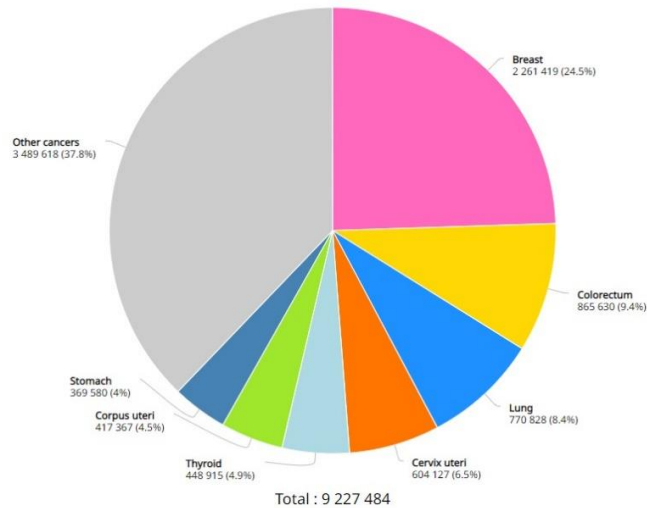


Figura 3. Numero di nuove diagnosi registrate per tumore al polmone nel sesso maschile (A) e nel sesso femminile (B), (anno 2020, dato standardizzato per età; <https://gco.iarc.fr>).

In Italia, i dati recenti dimostrano che nel 2024 sono stati registrati all'incirca 44.831 nuovi casi di tumore del polmone (suddivisi tra uomini con 31.891 casi e donne con 12.940 diagnosi): sono dati in linea con quelli sopramenzionati, poiché si tratta della seconda neoplasia più frequente negli uomini (15%) e della terza, invece, nelle donne (7,39%). Essendo il secondo tumore per frequenza negli uomini dopo la prostata (18,78%) nella fascia di età compresa tra i 50 e i 69 anni, un dato molto particolare per il tumore al polmone è ascrivibile al fatto che non rientra tra le prime 5 neoplasie per entrambi i sessi nella fascia inferiore ai 50 anni di età.

Nelle donne il tumore polmonare è meno frequente rispetto agli uomini ed, infatti, è al terzo posto nella fascia over 70 (8%) e risulta al quarto posto nella fascia di età inferiore alla precedente, 50-69 anni (7%)⁴. Relativamente alla prevalenza, invece, ad oggi sono complessivamente 117.800 le persone viventi in Italia dopo diagnosi di tumore al polmone (divise per sesso, uomini 77.200 e donne 40.600)⁴. Concludendo con i tassi di mortalità, dagli ultimi report riportati (2022), in Italia si verificano 35.700 decessi all'anno per tumore del polmone, 12.100 nelle donne e quasi il doppio negli uomini (23.600). Se invece guardiamo il dato della sopravvivenza a 5 anni, si parla di risultati importanti dove fino ad un decennio fa non era neppure ipotizzabile raggiungere la soglia del 10%: ad oggi è pari al 16% negli uomini e al 23% nelle donne.

Infine, resta ancora evidente un netto divario tra uomini e donne sui progressi nella mortalità oncologica. Infatti, negli uomini, il 36,6% delle morti oncologiche evitate nel periodo 2007-2019 è legato ai progressi compiuti nella lotta al tabagismo, oltre a pratiche migliorate quelle messe in campo diagnostico-terapeutico negli ultimi anni. Nelle donne, invece, è stato riportato un eccesso di 16.036 morti per tumore del polmone, il 16,0% in più di quanto atteso, dal momento che nel 2019 ha mostrato una prima tendenza a migliorare rispetto agli anni precedenti. Un quadro, quindi, che sostanzialmente riflette diverse abitudini al fumo nei due sessi nei decenni precedenti e riguarda soprattutto donne di 70 anni di età⁵.

2 CENNI DI EZIOPATOGENESI DEI TUMORI POLMONARI

Il fumo di sigaretta è responsabile dell'80-85% dei casi di neoplasie polmonari in Italia e nel Mondo, ed è maggiormente correlata al sottotipo istologico del carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) e all'istologia squamocellulare⁶. Da un documento realizzato dalla Doxa su incarico dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), in collaborazione con l'Istituto di ricerche farmacologiche⁷, si evince come l'abitudine al fumo in Italia stia calando, anche se ben radicata in almeno 1 soggetto su 4 dell'intera popolazione (distribuito tra il 30,2% degli uomini ed il 18,5% delle donne con una età media di 45-46 anni), con una variabilità legata alle differenti aree geografiche del nostro Paese. Da questa analisi emerge un dato allarmante, ovvero un incremento di fumatori di entrambi i sessi (anche se più marcato nei soggetti di sesso maschile) soprattutto nel Sud Italia rispetto al Centro e Nord Italia. Un'altra importante considerazione deriva dalla diffusione dell'abitudine al fumo di sigaretta fra gli

adolescenti: le stime proiettano i “baby-fumatori” (minorenni tra i 14-17 anni) tra i protagonisti in negativo con una percentuale pari all’11% (più di 1/4 di milione di giovani coinvolti), risultando, quindi, una delle più alte tra i Paesi Europei⁵. In questo contesto è stata riscontrata una proporzionalità diretta tra il consumo annuale di pacchetti di sigarette, numero di sigarette fumate giornalmente, la durata dell'abitudine al fumo, il contenuto di sostanze tossiche e cancerogene nelle sigarette con la frequenza di ammalarsi di carcinoma polmonare⁸.

Considerando il rischio relativo (RR), la statistica è ben differente se si tratta di forti fumatori, ex fumatori e non fumatori. Ad esempio, il primo gruppo dei forti fumatori (con più di 20 sigarette al giorno fumate) ha un RR di almeno 20, a differenza dei non fumatori dove si attesta attorno a 14.

Condizione variabile nei soggetti che da poco hanno smesso di fumare: tale rischio diminuisce in maniera significativa con il passare degli anni (a partire da 10 anni) ed apporta dei benefici indescrivibili con il miglioramento dello stato di salute e degli anni di vita guadagnati, a patto che questa scelta venga fatta coerentemente prima dei 45-50 anni di età⁹. In combinazione con il fumo di tabacco, il principale agente eziologico correlato ad un aumentato rischio di sviluppare tumori polmonari, ci sono diverse sostanze utilizzate in ambienti lavorativi o di provenienza ambientale quali asbesto, radon, cromo, arsenico, berillio, cloruro di vinile, idrocarburi aromatici policiclici, che possono sprigionare la loro attività cancerogena/mutagena¹⁰, (**Figura 4**).

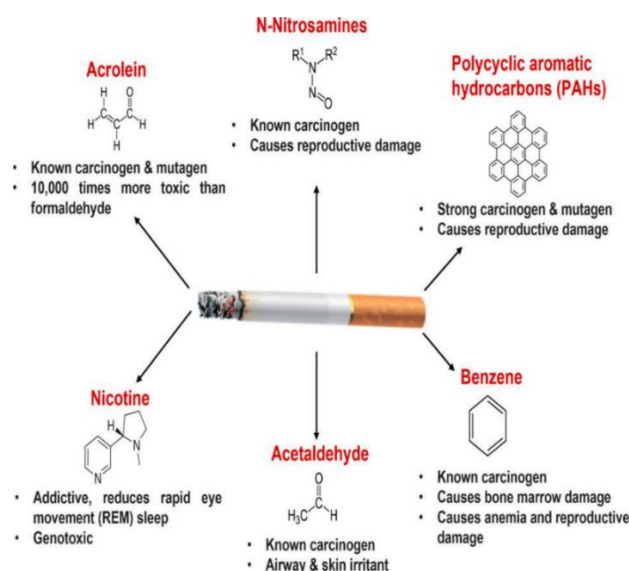


Figura 4. Le principali sostanze cancerogene presenti nel tabacco¹¹.

Una breve parentesi è necessaria anche sulla sigaretta elettronica (e-cig) che sta condizionando, in particolar modo, le vite di soggetti ex-fumatori che non sono più disposti

a fumare la sigaretta tradizionale, ignorando però nello stesso tempo quei rischi esistenti correlati all'insorgenza dei tumori polmonari. È noto che la sigaretta elettronica rappresenta una valida alternativa al fumo di tabacco, poichè simula la sigaretta tradizionale, portando ad inalare vapore contenente una quantità di nicotina necessaria a soddisfare lo stato di dipendenza e assuefazione fisica. I liquidi delle e-cig sono composti da acqua, glicole propilenico, glicerolo o entrambi, più aromatizzanti e ovviamente nicotina (generalmente tra 6 e 20 mg), il più conosciuto tra gli alcaloidi vegetali ¹². Occorre ricordare che, in seguito al riscaldamento del glicole propilenico e della glicerina, questi possono portare alla formazione di emiacetali contenenti formaldeide ¹³. Anche per questo motivo, la formaldeide è stata inserita dallo IARC di Lione nel gruppo 1 delle sostanze cancerogene certe.

Altro *device* che si è diffuso sul mercato in questi ultimi anni è IQOS, che si occupa di riscaldare il tabacco ad una temperatura significativamente più bassa senza bruciarlo. Seppur siano state ipotizzate quantità di sostanze chimiche tossiche derivate dalla combustione nettamente inferiori rispetto alle sigarette normali, non è ancora del tutto chiaro se questo tipo di sigaretta con tabacco riscaldato contenga la stessa quantità di nicotina e gli stessi composti volatili (idrocarburi policiclici aromatici, nitrosamine, anidride carbonica) presenti nelle sigarette classiche ^{14,15}. Attualmente non ci sono evidenze solide riguardanti sicurezza ed efficacia a lungo termine di questi dispositivi nel ridurre drasticamente il livello di assuefazione al consumo di sigaretta, come nemmeno la certezza che il loro uso possa favorire la riduzione del rischio di insorgenza di tumore polmonare rispetto all'uso della sigaretta tradizionale.

Al netto di queste evidenze, lo IARC ha deliberato che l'inquinamento atmosferico e le polveri sottili rientrano a far parte delle sostanze di classe 1, ovvero sicuramente cancerogene, seppur i risultati dei vari studi condotti affermino che non esistono limiti al di sotto dei quali l'effetto di una possibile correlazione tra esposizione e rischio di sviluppare i tumori polmonari possa dissolversi ¹⁶.

In un contesto multifattoriale ed eziopatogenetico più ampio dei tumori polmonari, uno slot è riservato ai polimorfismi genici, a conferma del fatto che tali tumori hanno una componente ereditaria non trascurabile, per cui discriminare i geni implicati nella suscettibilità ereditaria alla carcinogenesi può essere importante nella stratificazione dei gruppi di pazienti a maggior rischio ^{17,18}.

3 CLASSIFICAZIONE ISTOLOGICA DEI TUMORI POLMONARI

Da un punto di vista istologico, la classificazione delle neoplasie polmonari è quella proposta dalla *WHO (World Health Organization, ultimo aggiornamento 2021)*, che prevede la suddivisione dei carcinomi polmonari in vari sottogruppi istologici, ciascuno definito anche da determinate caratteristiche molecolari. Tra i tumori maligni invasivi del polmone, i due principali sottotipi istologici sono i carcinomi polmonari non a piccole cellule (*Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC*, circa 80-85%) e i carcinomi polmonari a piccole cellule (*Small Cell Lung Cancer, SCLC*, circa 15-20%). I carcinomi non a piccole cellule includono i carcinomi spinocellulari o squamocellulari e gli adenocarcinomi. Tra gli istotipi meno frequenti si annoverano i carcinomi neuroendocrini a grandi cellule (*Large-Cell Neuroendocrine Carcinoma, LCNEC*), i carcinomi pleomorfi, i carcinomi sarcomatoidi ed altri tipi istologici più rari (**Figura 5**),¹⁹.

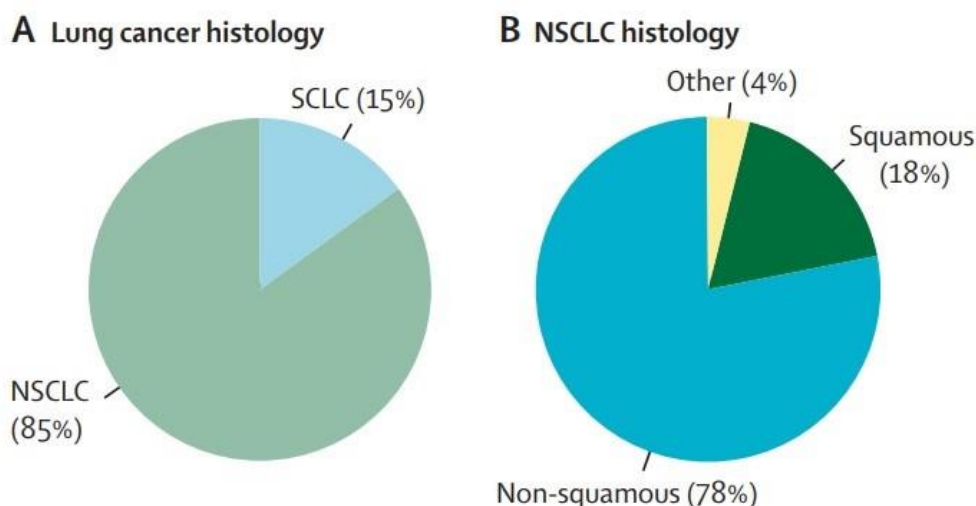


Figura 5. Grafico a torta rappresentante la classificazione istologica dei tumori polmonari. **A)** Istologia dei tumori al polmone (NSCLC e SCLC); **B)** Istologia con focus su NSCLC ³.

Il *Carcinoma Squamocellulare* origina generalmente dai tessuti che rivestono i bronchi. Deriva, infatti, da una crescita incontrollata delle cellule tumorali in prossimità delle vie aeree di medio-grosso calibro, con conseguenti lesioni che, con il trascorrere del tempo, diventano evidenti. Ci sono diversi fattori di rischio eziologici che promuoverebbero la comparsa di questo tumore: dal consumo di tabacco e fumo passivo, all'esposizione seppur in maniera meno frequente al gas radon, all'amianto e/o ad altre sostanze cancerogene come arsenico ^{20,21}. Tra gli aspetti microscopici si riconoscono cheratina, presenza di ponti

intercellulari e perle cornee con un citoplasma omogeneo e spiccato in eosinofilia, acquisendo tutte quelle caratteristiche dei tumori ben differenziati. Inoltre, il carcinoma squamocellulare risulta spesso positivo per p40, p63, citocheratine ad alto peso molecolare (CK5 e CK6) e desmocollina-3 ²².

Il *Carcinoma a piccole cellule (small cell lung cancer, SCLC)* è una neoplasia invasiva molto aggressiva con localizzazione centrale e rappresenta almeno il 10-15% di tutti i tumori polmonari, condividendo caratteristiche neuroendocrine, epiteliali e molecolari con gli squamocellulari. Ha una allocazione nella regione peribronchiale e tende ad infiltrare facilmente la sub-mucosa bronchiale ed il suo tessuto, sfociando nella formazione di metastasi linfonodali. Da un punto di vista istologico, si riconoscono piccole cellule di un'unica morfologia con pochissimo citoplasma, un nucleo di forma tonda, un nucleolo piccolo difficilmente apprezzabile e aree di necrosi distinguibili con un alto grado di mitosi (mediamente 80 mitosi per 2 mm² di area). La valutazione mediante immunistochemica (IHC) di alcuni marcatori neuroendocrini evidenzia in questi tumori alti livelli di espressione di cromogranina (CgA), enolasi neurospecifica (NSE) e citocheratine con una positività puntiforme, TTF-1, CD56 (nel 70-80% dei casi testati) ed un elevato indice proliferativo Ki67/MIB-1 (>70%),²³.

L'*adenocarcinoma (ADC, 30-45%)* è un istotipo con diffusione linfonodale loco-regionale, intraparenchimale e aerogena e, il più delle volte, con una precoce metastatizzazione a distanza. È una neoplasia epiteliale maligna e, quindi, invasiva. La lesione si localizza perifericamente (con frequente interessamento pleurico) e nasce a livello di quelle aree cicatriziali del parenchima che, a causa della sua progressiva espansione da lobo a lobo, possono arrivare a colpire entrambi i polmoni. È l'istotipo tumorale maggiormente rappresentato nelle donne e negli uomini di età inferiore ai 50 anni ²⁴ e la sua incidenza è aumentata nel corso del tempo, diventando la forma più comune e superando anche quella del carcinoma squamocellulare. Da un punto di vista citologico, l'ADC è generalmente costituito da cellule epiteliali di aspetto cuboidale o colonnare, con nuclei uniformi e rotondi, con contorni regolari e con un citoplasma che può presentarsi cianofilo, traslucido oppure vacuolizzato ¹⁹. L'istotipo ADC presenta una frequente positività per TTF-1 (transcriptional thyroid factor 1), citocheratina (CK-7) e Napsina A ²⁵. La nuova classificazione elaborata dalle maggiori società scientifiche a livello internazionale, quali l'International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), l'American Thoracic Society (ATS) e l'European Respiratory Society (ERS) ¹⁹, permette di distinguere, oltre gli ADC invasivi, quattro/cinque varianti suddivise in relazione alle loro caratteristiche istopatologiche: *lesioni preinvasive, adenocarcinoma minimamente invasivo (MIA) non*

mucinoso, mucinoso e misto, variante classica dell'ADC nella quale avremo differenti *patterns* di crescita che seguono una specifica architettura (acinoso, lepidico, papillare, micropapillare e solido) e varianti alternative. Inoltre, è possibile distinguere nell'adenocarcinoma mucinoso invasivo (non più riconosciuto e classificato come carcinoma bronco alveolare mucinoso), l'istotipo colloide, l'adenocarcinoma enterico e fetale.

Il *Carcinoma a grandi cellule (large cell lung cancer, LCLC)* è un istotipo che segue una crescita rapida con una possibile infiltrazione nella regione ilare. Essendo una neoplasia epiteliale maligna indifferenziata, è generalmente priva degli aspetti citologici comuni alle altre forme di carcinoma polmonare. Include il 5-10% dei carcinomi polmonari. Può avere localizzazione a livello periferico o centrale presentando spesso aree di necrosi emorragica. Le cellule che lo compongono hanno una struttura e dimensioni variabili, spesso poligonali con un nucleo grande, un nucleolo sporgente, un ridotto rapporto nucleo/citoplasma e, infine, con una cromatina nucleare vescicolare. Con la nuova classificazione del WHO 2021, il carcinoma a grandi cellule inizia ad essere considerato un istotipo a sé stante, a differenza dei carcinomi neuroendocrini a grandi cellule (*large cell neuroendocrine cancer, LCNEC*) che vengono classificati come carcinomi neuroendocrini o dei carcinomi basalioidi che fanno parte di un istotipo squamocellulare.

LCNEC si presenta come una o più lesioni invasive delle vie aeree che danno necrosi (definita a carta geografica) e apportano infiltrazioni localizzate a livello bronchiale e mediastinico ¹⁹. LCNEC sono definiti da una conta mitotica elevata >10 per 2 mm^2 , caratterizzati da zone di necrosi multiple e da un bassissimo o scarso grado di differenziazione. Può presentarsi in una forma combinata con adenocarcinoma e carcinoma squamocellulare. Ha una prognosi sfavorevole per mancanza di marcatori immunoistochimici rilevabili ^{26,27}.

All'interno della classificazione dei LCNEC, oltre ai microcitomi di cui abbiamo già parlato, vi è il gruppo dei tumori neuroendocrini del polmone (NET) che includono, oltre ai microcitomi già citati, anche i carcinoidi polmonari.

I carcinoidi polmonari rappresentano una minuscola fetta dei carcinomi polmonari in quanto riportano una frequenza limitata dell'1-2%, con un basso grado di malignità e vengono distinti in tipici e atipici. Sono neoplasie con una eterogeneità variabile, con presenza di granuli densi, caratterizzati dalla positività ai markers di differenziazione neuroendocrina, quali cromogranina (CgA), enolasi neurone-specifica (NSE) e proteine di adesione cellulare. I carcinoidi tipici sono tumori benigni, con dimensioni inferiori a 3 cm, a cui si associa un basso grado di coinvolgimento linfonodale (5-15%). Hanno un aspetto

organoide con una mancanza di necrosi (struttura a “rosetta”) ed uno scarso indice mitotico. La sopravvivenza a 5 anni è stimata attorno al 90-98% dei casi. I carcinoidi atipici hanno, invece, un decorso clinico più aggressivo, con dimensioni generalmente superiori ai 3 cm di diametro ed è apprezzabile un interessamento a livello linfonodale inferiore al 50% dei casi con occasionali metastasi a distanza. Come i precedenti, presentano un aspetto organoide ma con l’aggiunta di focolai necrotici ed una aumentata attività mitotica^{28,29}.

4. DIAGNOSI E STADIAZIONE DEI TUMORI POLMONARI

Al fine di ottenere una corretta impostazione a livello diagnostico per le neoplasie polmonari è importante, innanzitutto, avviare la raccolta anamnestica di eventuali fattori di rischio e comorbidità del paziente e procedere con l’esame fisico approfondito. Seguono l’utilizzo delle tecniche di *imaging* (Rx torace per l’individuazione di macro-anomalie a livello del parenchima polmonare e successivamente una TC torace per una visualizzazione con maggior accuratezza del parenchima polmonare) e, in caso di riscontro di una sospetta lesione neoplastica, l’esecuzione di una biopsia istologica o di un prelievo citologico.

Per la tipizzazione istologica, è dirimente orientare un accurato iter terapeutico dei tumori polmonari a piccole cellule e non a piccole cellule. Infatti, la scelta dell’esame più appropriato dipende dalle dimensioni e dalla localizzazione della sospetta neoplasia polmonare, in particolare la sede (centrale o periferica) del tumore primitivo, dai *pattern* di crescita per le lesioni endobronchiali o peribronchiali, e/o dalle metastasi alle stazioni linfonodali ilo-mediastiniche³⁰.

Se parliamo di mancanza di controindicazioni con entità grave, i pazienti che presentano una sospetta lesione neoplastica alla TC, possono essere sottoposti a broncoscopia, al fine di discriminare lesioni centrali e/o periferiche. Mentre, se il focus si sposta verso i tumori centrali peribronchiali, questi ultimi possono essere biopsizzati per via endoscopica transbronchiale (EBUS) o trans-esofagea (EUS). In merito alle lesioni periferiche, invece, la sensibilità diagnostica cambia in base alle dimensioni della lesione, alle connessioni con l’albero bronchiale e alla tipologia di strumento impiegato. In poche parole, quest’ultima può godere di un approccio per via broncoscopica *imaging*-guidata, oppure per via transtoracica percutanea TC-guidata (TTNA), che permetterebbe di ottenere un prelievo più efficace però, di contro, un rischio più elevato di sviluppare uno pneumotorace iatrogeno³¹.

La diagnosi e cura delle neoplasie polmonari procede di pari passo con i miglioramenti tecnologici della diagnostica oncologica molecolare, per cui una corretta profilazione

molecolare permetterebbe una miglior definizione delle caratteristiche del tumore, con una conseguente maggior disponibilità di ottenere trattamenti terapeutici personalizzati per i pazienti³². L'iter diagnostico non si basa soltanto sulla stadiazione clinica della malattia ma anche sull'estensione e sullo stato di avanzamento della malattia stessa.

Una volta aver chiarito i principali aspetti della diagnosi di tumore polmonare, lo step successivo è rappresentato dalla stadiazione del tumore stesso, dato importantissimo per poter stabilire una prognosi e definire una strategia terapeutica mirata per il paziente. La stadiazione del carcinoma polmonare viene fatta seguendo la classificazione TNM (proposta dalla *WHO*) che raccoglie le informazioni fornite da tre parametri differenti (**Tabella 1**): T, N, M.

Parametro T: tiene conto dell'estensione della malattia come infiltrazione a livello di tessuti/organi adiacenti, nonché delle dimensioni degli stessi. I valori di T sono variabili da 0 a 4.

Parametro N: consente di valutare il grado di interessamento linfonodale da parte del tumore, generalmente possono essere inclusi da 0 a 3.

Parametro M: considera la presenza di eventuali metastasi a distanza. Tiene in considerazione due valori: 0,1 (presenza, assenza di metastasi),^{33,34}.

Ricapitolando, alcuni importanti accorgimenti nella valutazione di un sospetto di neoplasia, bisogna tener conto di una variabilità rappresentata da forma, densità, dimensioni della lesione e accrescimento nel corso del tempo. Più diventa irregolare tale profilo in termini di forma con l'incremento delle dimensioni, più aumenta il rischio che la lesione possa essere maligna. Inoltre, la densità della massa può passare da omogenea a disomogenea. Allo stesso modo, più tale lesione si ingrandisce nel tempo, più il rischio di malignità della neoplasia si innalza. Concludendo, occorre ricordare che per la stadiazione viene impiegato il TC con mezzo di contrasto del torace e dell'addome, grazie ai quali è possibile ottenere informazioni più accurate rispetto ad altre indagini radiologiche relative a T, N e per alcune sedi M.

Infine, a seconda dello specifico caso di neoplasia da trattare, possono essere richiesti ulteriori approfondimenti complementari che possono dettagliare il quadro diagnostico-patologico³⁵.

Tabella 1. Classificazione clinica TNM aggiornata al 2025 (IX edizione, IASLC), utilizzata per la stadiazione dei NSCLC.

TNM 9 th edition			
Tx	Tumor in sputum/bronchial washings not assessed in imaging/scopy	Nx Regional lymph nodes cannot be assessed	
T0	No evidence of primary tumor	N0 No regional lymph node metastasis	
Tis	Carcinoma in situ	<ul style="list-style-type: none"> • Ipsilateral peribronchial and/or • Ipsilateral hilar and/or • Intrapulmonary lymph nodes, including involvement by direct extension 	
T1	<ul style="list-style-type: none"> • ≤ 3 cm, surround by lung/visceral pleura, or in lobar or peripheral bronchus • T1mi Minimally invasive adenocarcinoma • T1a ≤ 1 cm • T1b >1 cm but ≤ 2 cm • T1c >2 cm but ≤ 3 cm 		N1
	<ul style="list-style-type: none"> • T2a > 3cm but ≤ 4cm • or invasion of main bronchus without carina or invasion visceral pleura, transgression fissure, invading adjacent lobe • Atelectasis or obstructive pneumonitis extending to the hilum • T2b >4 cm but ≤ 5 cm 		N2 <ul style="list-style-type: none"> • Metastasis in ipsilateral mediastinal /subcarinal nodes • N2a Single N2 station involvement • N2b Multiple N2 station involvement
T3	<ul style="list-style-type: none"> • >5 cm but ≤ 7 cm • or invasion parietal pleura, chest wall, pericardium, phrenic nerve, azygos vein, thoracic nerve roots (T1, T2) or stellate ganglion • or separate nodules in same lobe 		M0
	<ul style="list-style-type: none"> • > 7 cm • or invasion mediastinum, thymus, trachea, carina, recurrent laryngeal nerve, vagus nerve, esophagus, diaphragm • or invasion heart, great vessels, intrapericardial pulmonary arteries/veins, supra-aortic arteries, brachiocephalic veins, subclavian vessels, vertebral body, lamina, spinal canal, cervical nerve roots, brachial plexus. • or separate nodules in different ipsilateral lobe 	M1	<ul style="list-style-type: none"> • Distant metastasis • M1a Pleural or pericardial nodules or malignant pleural or pericardial effusions Separate tumor nodule(s) in contralateral lobe • M1b Single extrathoracic metastasis in a single organ system • M1c1 Multiple extrathoracic metastases in a single organ • M1c2 Multiple extrathoracic metastases in multiple organs
T4			

Abbreviazioni. Grandezza del tumore primario (T), Convolgimento linfonodale (N), Metastasi a distanza (M).

Di seguito, vengono mostrate le linee guida IASLC che includono i 4 stadi principali di malattia con i rispettivi sottotipi (**Tabella 2**), ³⁶.

Tabella 2. Linee guida IASLC 2025.

	N0	N1	N2a	N2b	N3
T1a	IA	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T1b	IA	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T1c	IA	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB	IIIB
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIB
T3	IIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC
M1a	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
M1b	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
M1c	IVB	IVB	IVB	IVB	IVB

5. ASPETTI MOLECOLARI NEI TUMORI DEL POLMONE

La caratterizzazione molecolare dei tumori del polmone è un elemento fondamentale del percorso di diagnosi e cura del paziente, poiché oggi è normale pratica clinica raccomandare trattamenti a bersaglio molecolare in popolazioni selezionate in base alla presenza o l'espressione di un determinato marcatore.

Le mutazioni più frequenti presenti nei tumori polmonari NSCLC riguardano i seguenti geni: *TP53* (*tumor protein 53*, 53.6%), *KRAS* (*Kirsten Rat Sarcoma*, 16.1%), *STK11* (*Serine/threonine kinase 11*, 9.8%), *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*, 7.2%), *KEAP1* (*Kelch-like ECH-associated protein 1*, 6.6%), ed *NFE2L2* (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, 4.5%) ³⁷.

Nell'adenocarcinoma del polmone le mutazioni più spesso riscontrate sono quelle a carico dei geni *KRAS* (nel 32.6% dei casi) e *STK11* (nel 17.4%). Frequentemente si riscontrano però anche mutazioni a carico di *EGFR*, (circa 10-15% dei casi), che constano per circa il 90% di delezione *in-frame* nell'esone 19 e la mutazione puntiforme

p.(Leu858Arg) nell'esone 21; mutazioni a carico di *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*) si riscontrano invece nel 3-4% dei pazienti affetti da adenocarcinoma e sono per il 50% dovute al cambio missenso p.(Val600Glu), percentuale notevolmente inferiore a quella registrata per altri tipi di tumore, quali il melanoma o il tumore papillifero della tiroide, dove la prevalenza di questa alterazione è molto più elevata. Meno frequenti sono mutazioni ritrovate negli adenocarcinomi variante classica del polmone a carico di *HER2* (*v-erb- b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homo- log 2*), (4%), prevalentemente dovute a un'inserzione *in-frame* a carico dell'esone 20 e quelle a carico di *MET* (*Mesenchymal Epithelial Transition facto*), che causano lo *skipping* dell'esone 14. Altre alterazioni molecolari riscontrate in associazione all'istologia dell'adenocarcinoma sono le fusioni geniche che coinvolgono *ALK* (*Anaplastic Lymphome Kinase, 3-5%*), *ROS1* (*c-ros oncogene 1, 1-3%*),³⁸ e *RET* (*Rearranged during Transfection, 2%*). Sono presenti, infine, alterazioni molecolari caratteristiche di alcuni sottotipi specifici di adenocarcinoma del polmone. Negli adenocarcinomi mucinosi invasivi, ad esempio, sono state recentemente descritte, oltre che frequenti mutazioni le mutazioni a carico di *KRAS* (60% dei casi rispetto), fusioni a carico del gene *NRG1* (*neuregulin-1*), in una percentuale variabile tra l'8 e il 10% e che si ritrovano nella variante classica di ADC con una frequenza <1% dei casi³⁹.

Nei carcinomi squamosi, invece, sono presenti con maggiore frequenza mutazioni a carico di *NFE2L2* (*NF-E2-related factor 2*) nel 10.6% dei casi, *DDR2* (*discoidin domain receptor tyrosine kinase 2*) nell'1.1% dei casi e *FGFR3* (*fibroblast growth factor receptor 3, 0.8%*)⁴⁰, mentre nei mucrocitomi l'alterazione molecolare più caratteristica è la mutazione di *MYCN* (*MYCN Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor* , 6.5%), assieme alla delezione del gene *RBI* (*RB transcriptional corepressor 1*),⁴¹. Purtroppo, la maggior parte delle alterazioni molecolari sono prive di terapia mirata e non hanno un impatto clinico sulla sopravvivenza negli ADC, LCC e SqCC (**Figura 6**).

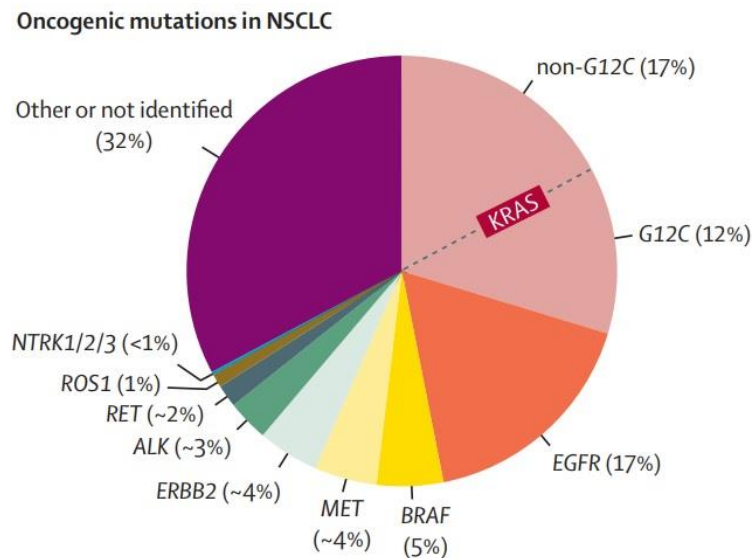


Figura 6. Alterazioni genomiche divise per istotipo di tumore polmonare ³.

6. STRATEGIE TERAPEUTICHE NEI NSCLC

Il trattamento d'elezione dei carcinomi polmonari non a piccole cellule è rappresentato oggi dalla resezione chirurgica per i pazienti con malattia allo stadio iniziale. La chirurgia radicale rappresenta il trattamento di prima scelta in grado di ottenere una guarigione completa o di migliorare significativamente la prognosi, mentre una resezione non radicale causa una sopravvivenza sovrapponibile a quella dei casi non operati. La chirurgia rappresenta il trattamento elettivo nei NSCLC per lo stadio I, II e ed in alcuni pazienti selezionati in stadio IIIA/IIIB (T1-T3, N2 singola stazione, non-bulky, valutati nell'ambito di gruppi multidisciplinari). A tal proposito, in tutti i pazienti con NSCLC in stadio IIIB-IIIC (non candidati a trattamenti loco-regionali) e IV, risulta raccomandato implementare la diagnosi morfologica (di cui sopra) con la caratterizzazione delle mutazioni nei geni *EGFR*, *BRAF* e *KRAS* (mutazione p.G12C), la definizione delle traslocazioni a carico di *ALK*, *ROS-1*, *NTRK 1,2 e 3* (*Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase*), *RET*, lo *skipping* dell'esone 14 del gene *MET* e la valutazione dei livelli di espressione del PD-L1 (Programmed-death ligand 1), (secondo i *cut-off* validati dagli studi clinici registrativi),⁴².

Per i pazienti che presentano alla diagnosi uno stadio avanzato di malattia o che non rispettano i criteri di operabilità (circa i 2/3 dei casi), l'approccio curativo di prima linea si basa su chemioterapia/radioterapia. La radioterapia stereotassica può essere usata come terapia adiuvante per pazienti con NSCLC resecabile senza controindicazioni per la chirurgia, oppure può essere il primo trattamento locale o come terapia palliativa per pazienti con NSCLC incurabile⁴². Per quanto concerne invece la chemioterapia, è possibile affermare che la terapia adiuvante impatta sulla storia naturale della malattia, ma non può essere somministrata a tutti i pazienti, per via delle possibili tossicità correlate. La maggior parte dei tumori risulta comunque refrattario al trattamento o sviluppa resistenza dopo una iniziale risposta.

Pazienti affetti da NSCLC con malattia localmente avanzata (III) e metastasi linfonodali mediastiniche N2 non sono candidati al trattamento chirurgico "*ab initio*", ma vengono sottoposti ad un trattamento neoadiuvante di induzione radio-chemioterapico, seguito da resezione locale, con la raccomandazione di una completa valutazione preoperatoria della funzionalità cardiaca e polmonare per prevenire complicanze correlate. Un altro aspetto da considerare nella scelta terapeutica, oltre allo stadio della malattia, è rappresentato dall'età del paziente e dalle sue comorbidità, che sono spesso causa di esclusione dalla terapia chirurgica e/o chemioterapia. Una ridotta funzionalità d'organo, soprattutto renale, epatica, e midollare, potrebbe infatti determinare un incremento degli effetti collaterali della chemioterapia⁴³.

Gli ultimi decenni di intense ricerche biologiche e cliniche hanno ampliato il consenso in riferimento all'appropriata gestione terapeutica di pazienti con carcinoma polmonare, anche se la gestione totalmente personalizzata dei pazienti appare un traguardo ancora lontano da raggiungere in molti contesti. Alla terapia tradizionale, basata sulla differenziazione cito/istologica, negli ultimi anni si è infatti affiancata la terapia con farmaci biologici, che si sono dimostrati efficaci in specifiche categorie di NSCLC con malattia avanzata. Oggi, la terapia antineoplastica va sempre più verso la *targeted therapy* o terapia a bersaglio molecolare, nella quale si spera di trovare una maggiore efficacia e al contempo ridurre, grazie ad una aumentata selettività, gli effetti di citotossicità delle terapie convenzionali. La *targeted therapy* contempla una nuova generazione di agenti antitumorali disegnati per interferire con specifici bersagli molecolari del tumore che hanno un ruolo critico nella crescita o nella progressione dello stesso.

Un altro approccio terapeutico in pazienti con malattia avanzata è l'immunoterapia. Questo recente e nuova opzione terapeutica si basa sul concetto che l'insorgenza di un tumore e la sua progressione dipendono non soltanto dalle alterazioni molecolari, ma anche

dall'interazione delle cellule cancerogene con il sistema immunitario ^{44,45}. Nei pazienti con NSCLC avanzato senza alterazioni molecolari *driver* suscettibili di terapie a bersaglio molecolare, attualmente la scelta del trattamento si basa principalmente sull'istologia, sulle condizioni generali del paziente e sue comorbilità, e sul livello di espressione di PD-L1 (*program- med cell death-ligand 1*). In presenza di un'espressione di PD-L1 >50%, si può somministrare ai pazienti con carcinoma polmonare il pembrolizumab, anticorpo monoclonale, che legandosi al recettore PD-1, annulla l'attività delle cellule T e aumenta aumentando la capacità del sistema immunitario di distruggere le cellule in differenti tumori solidi.

6.1 LA TERAPIA A BERSAGLIO MOLECOLARE NEI NSCLC: APPROFONDIMENTI

Negli ultimi anni, i progressi della ricerca in ambito biologico-molecolare hanno permesso di identificare molteplici alterazioni genetiche a carico delle cellule tumorali e, di conseguenza, hanno portato ad un graduale cambiamento degli standard di cura dei pazienti affetti da NSCLC. Ciò ha consentito di avviare molti pazienti oncologici verso un percorso personalizzato di “*target therapy*”, che consiste nell'uso di farmaci “intelligenti”, che colpiscono bersagli specifici da cui dipende la proliferazione incontrollata delle cellule tumorali⁴⁶⁻⁴⁸. I vantaggi delle terapie target nei NSCLC sono ascrivibili, infatti, all'azione selettiva che le rende potenzialmente più efficaci in quanto mirate a colpire soltanto le cellule tumorali, superando il concetto di chemioterapia dove sono colpite indistintamente sia le cellule in attiva moltiplicazione che quelle normali. Inoltre, queste attuali terapie dimostrano un profilo terapeutico più sicuro con una migliore tollerabilità rispetto ai trattamenti standard (**Figura 7**).

Le linee guida attuali dell'Associazione italiana di Oncologia Medica raccomandano di eseguire la profilazione molecolare di determinati biomarcatori nei pazienti con NSCLC in stadio avanzato ⁴². Le raccomandazioni includono, con variazioni correlate all'istologia, l'analisi di mutazioni che coinvolgono gli esoni 18-21 del gene *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*), mutazioni a carico dell'esone 15 del gene *BRAF* (*B-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase*), e dei codoni 12-13 del gene *KRAS*, i riarrangiamenti a livello dei geni *ALK* (*Anaplastic Lymphoma Kinase*), *ROS1* (*ROS proto-oncogene 1*), *NTRK1/2/3* (*Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase*), *RET* (*REarranged during Transfection*) e l'analisi dello *skipping* dell'esone 14 del gene *MET* (*Mesenchymal Epithelial Transition*

factor), insieme alla valutazione dell'espressione di PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1). Per tutti questi marcatori sono disponibili farmaci approvati e rimborsabili (terapie target o immunoterapia) in prima linea di trattamento anche in Italia e in Europa ⁴⁹.

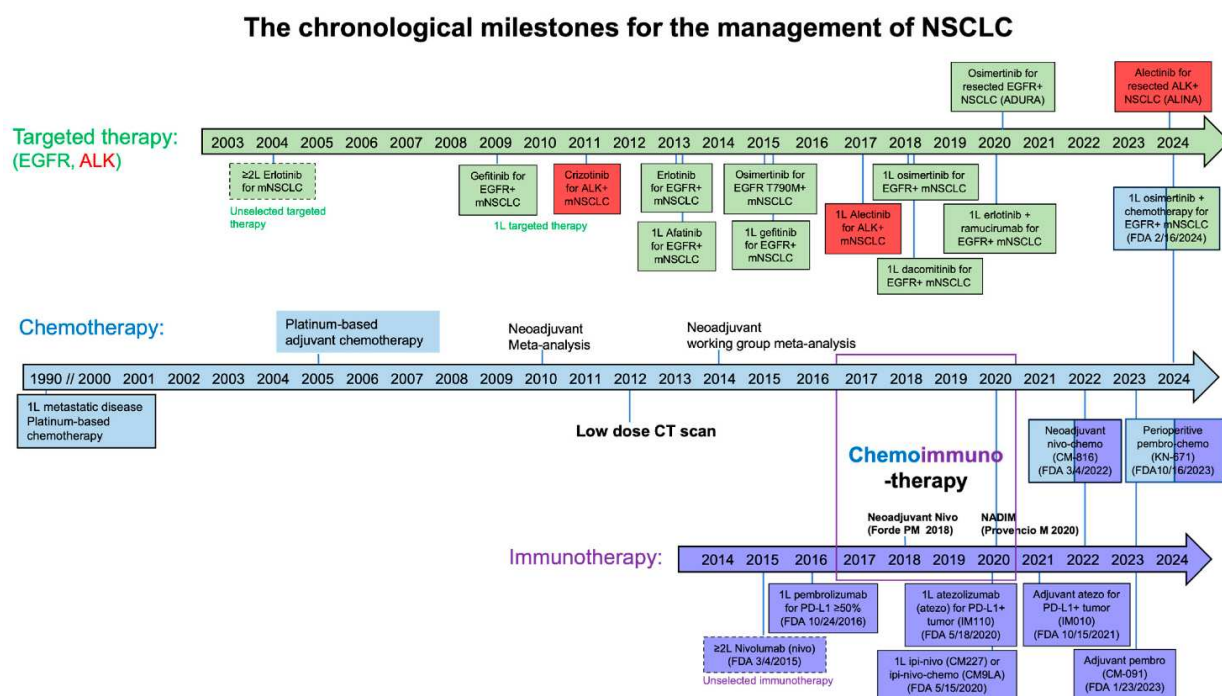


Figura 7. Timeline della target therapy nei pazienti affetti da NSCLC con le più frequenti alterazioni driver

50.

Altra pietra miliare del trattamento adiuvante basato su mutazioni di biologia molecolare, è il trial ADURA⁵¹ in cui si è dimostrata l'efficacia di osimertinib rispetto al placebo, nei pazienti in stadio IB-IIIa con EGFR mutato, dopo chirurgia radicale, in termini di intervallo libero da malattia.

Per molti anni, nei pazienti completamente resecati con stadi di malattia II-IIIa, il trattamento adiuvante di scelta è consistito nella chemioterapia a base di platino, che tuttavia offre tuttavia un beneficio limitato⁵². Più recentemente, è stata dimostrata l'efficacia in ambito adiuvante di terapie biologiche già utilizzate da anni nel trattamento dei pazienti con NSCLC in stadio avanzato ed è stato introdotto lo screening molecolare del gene *EGFR* anche in ambito adiuvante ⁵³. In particolare, lo studio ADAURA ha dimostrato un significativo beneficio in termini di sopravvivenza libera da malattia (DFS) e sopravvivenza globale (OS) nell'uso dell'inibitore della tirosina chinasi del recettore EGFR osimertinib in

ambito adiuvante, nei pazienti con adenocarcinoma polmonare resecato con mutazioni attivanti negli esoni 19 e 21 del gene *EGFR*⁵⁴. Di conseguenza, le linee guida AIOM hanno recentemente raccomandato lo screening dell'*EGFR* nei tumori IB-IIIa resecati precocemente per selezionare i candidati al trattamento con osimertinib in ambito adiuvante⁴².

Nel caso in cui i pazienti siano negativi per alterazioni molecolari in geni *driver*, e quindi definiti “*non-oncogene addicted*”, riveste una grandissima importanza nei NSCLC in fase avanzata l'utilizzo di farmaci inibitori dei checkpoint immunitari, il cui impiego attuale si basa sul livello di espressione del programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) nelle cellule tumorali, determinata mediante indagini di immunistochemica^{42,49}.

In tempi recentissimi, nuovi trial hanno dimostrato efficacia del trattamento adiuvante con immunoterapia adiuvante negli stadi IB, II e IIIA. Tra questi il primo, e più rappresentativo è sicuramente il trial ALINA⁵⁵ che dimostra come il trattamento con Alectinib, inibitore di Tirosinchinasi, abbia significativamente l'intervallo libero da malattia rispetto ai pazienti trattati con chemioterapia.

6.1.1 LE MUTAZIONI DEI GENI EGFR E SIGNIFICATO CLINICO

Il gene *EGFR* mappa sul cromosoma 7p12-13 e codifica per un recettore tirosin-chinasico di 170kDa. Le alterazioni di *EGFR*, il cui recettore omonimo è noto anche come ErbB1 (*Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene homolog 1*) e appartenente alla famiglia di recettori tirosin-chinasici ErbB, sono tra le alterazioni più frequentemente riscontrate nel cancro polmonare⁵⁶. Nell'est dell'Asia le alterazioni dell'*EGFR* sono più frequenti in soggetti non fumatori, ancor più se hanno sviluppato un adenocarcinoma e se sono donne (**Figura 8**).

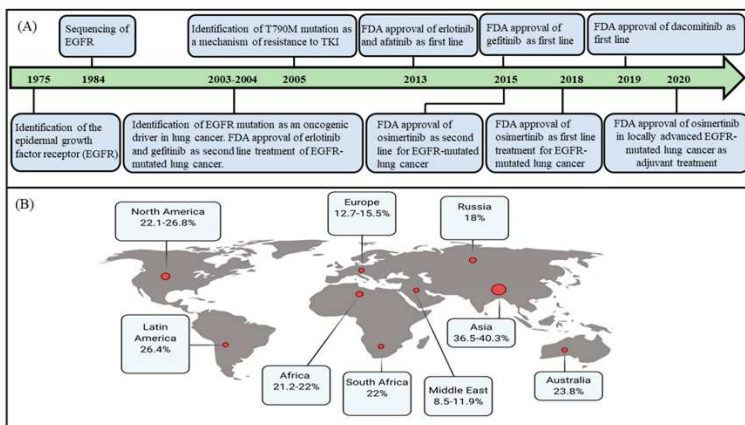
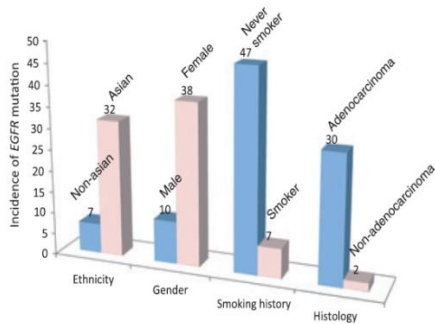


Figura 8. Incidenza di mutazioni in *EGFR* nei tumori polmonari in differenti background clinici ^{56,57}.

Tutti i recettori ErbB hanno tre domini funzionali: un *binding-domain* extracellulare, un dominio transmembrana ed un dominio intracellulare tirosino-chinasi.

In condizioni di riposo, tali recettori, si trovano in uno stato non fosforilato ed in forma monomeric. HER1/EGFR, presente nella maggior parte delle cellule normali, è il recettore per vari ligandi endogeni, tra cui il fattore di crescita epidermico (EGF) ed il fattore di crescita trasformante (TGF-alfa). Il legame del ligando promuove l'accoppiamento del recettore con un'altra proteina recettoriale adiacente, in genere HER2, con formazione di un dimero; la dimerizzazione del recettore provoca la auto-fosforilazione di specifici residui di tirosina C-terminali del dominio intracellulare. A sua volta, il recettore attivato fosforila alcune proteine citoplasmatiche (tra cui RAS), che scatenano una serie di reazioni a cascata lungo le vie di trasduzione del segnale che regolano i processi di differenziamento, crescita e proliferazione cellulare, invasione ed adesione cellulare, regolazione dell'apoptosi e dell'angiogenesi.

Pertanto, un'alterazione della regolazione dell'attività del recettore e quindi la rottura dell'equilibrio tra processi di crescita e di morte cellulare determina uno sbilanciamento a

favore dell'iperproliferazione che può rappresentare l'input allo sviluppo dei tumori. Tra le alterazioni sono annoverate le mutazioni che si riscontrano principalmente nei quattro esoni (ex 18-21) che codificano per il dominio tirosino-chinasico. Nel 90% dei casi tali mutazioni sono piccole delezioni *in-frame* di cinque amminoacidi nell'esone 19 (codoni 746-750, LREA) o la mutazione puntiforme p.(Leu858Arg), (**Figura 9**).

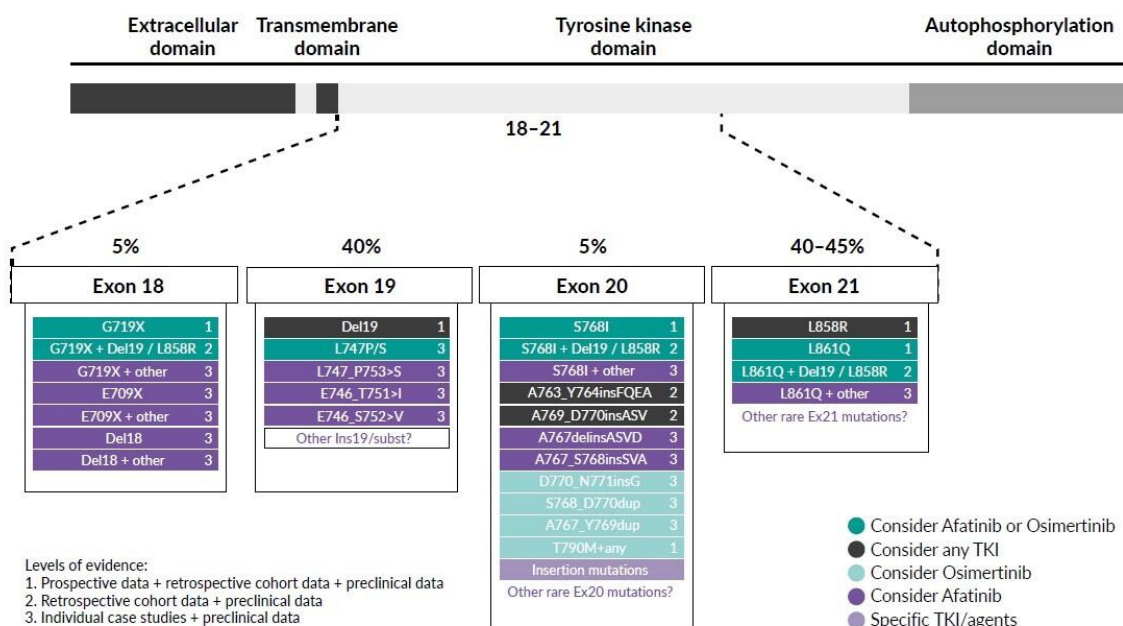


Figura 9. Varianti oncogeniche di *EGFR*; rappresentazione dei domini e loro principali mutazioni⁵⁸.

Del18, delezione esone 18; Del19, delezione esone 19 deletion; EGFR, epidermal growth factor receptor; Ex, esone; Ins19, inserzione esone 19; Subst, sostituzione; TKI, tyrosine kinase inhibitor.

Da tali alterazioni ne consegue una costitutiva fosforilazione di EGFR in assenza di stimolazione da ligando. Il recettore EGFR mutato attiva selettivamente la cascata del segnale intracellulare che promuove la sopravvivenza e la proliferazione cellulare attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione STAT (*Signal Transducers and Activator of Transcription*), mentre EGFR mutato non induce segnali mitogeni inducenti la proliferazione attraverso l'attivazione delle proteine chinasi MAPK (*Mitogen Activated Protein-Kinase*),
59,60

Le mutazioni attivanti nel dominio tirosino-chinasico di EGFR rappresentano le lesioni molecolari oncogeniche *druggable* più comuni nel NSCLC metastatico ad istologia non-squamosa e mostrano una ben documentata incidenza, variabile tra il 10% nella popolazione europea, e più del 64% nella popolazione asiatica⁶¹⁻⁶³. Recentemente è stato raccomandato

lo screening di *EGFR* anche nella pratica clinica dei pazienti NSCLC *early-stage* resecati in setting adiuvante, ma i dati sulla prevalenza e sulla distribuzione delle mutazioni di *EGFR* in questo gruppo di pazienti sono al contrario molto più limitati^{64,65}. Inoltre, gli studi pubblicati sono stati condotti prevalentemente su coorti di pazienti NSCLC pre-selezionate, e quindi spesso soggetti a *bias* in termini di frequenza di mutazioni di *EGFR* o di altri oncogeni *driver* considerati quali potenziali fattori prognostici nei pazienti NSCLC *early-stage*, come il gene *KRAS*^{64,66}. Dati a lungo termine sull'andamento di malattia nei pazienti NSCLC *early-stage* resecati con mutazioni di *EGFR* sono anch'essi limitati, nonostante questo rappresenti un dato di estrema importanza nel contesto della terapia adiuvante anti-EGFR di recente approvazione negli NSCLC agli stadi II e III sopra citata. Infine, non è nota la prevalenza delle mutazioni di *EGFR* nella popolazione Italiana e nelle diverse aree geografiche, l'eventuale correlazione con i differenti sottotipi dell'adenocarcinoma polmonare, come non è ancora chiaro quali siano i pazienti a maggiore rischio di ricorrenza che possono maggiormente beneficiare del trattamento adiuvante con l'inibitore tirosin-chinasico della proteina EGFR mutata.

6.1.2 LE MUTAZIONI DEL GENE *KRAS* E SIGNIFICATO CLINICO

KRAS è una piccola guanosina trifosfatasi (GTPasi) che funge da interruttore in vari processi cellulari, accoppiando i recettori del fattore di crescita della membrana con vie di segnalazione intracellulare e fattori di trascrizione. Stimoli extracellulari, come fattori di crescita, fungono da interruttori di questo gene, che a sua volta è coinvolto nell'attivazione di vie di trasduzione a valle, che regolano la proliferazione, la migrazione, la sopravvivenza e la differenziazione della cellula.

KRAS esiste in due stati, inattivo legato al GDP (*KRas*-GDP) e attivo legato al GTP (*KRas*-GTP)⁶⁷. Le vie di segnalazione a monte di *KRAS* includono principalmente i recettori della superficie cellulare, come il recettore del fattore di crescita epidermico EGFR (ERBB1), il recettore 2 del fattore di crescita epiteliale umano HER2 (ERBB2), HER3 (ERBB3) e ERBB4. Trasmettono segnali attraverso *KRAS* dopo aver ricevuto segnali esterni. Questo processo stimola la proliferazione e la migrazione cellulare (**Figura 10**),⁶⁸.

KRAS è l'oncogene più frequentemente mutato in diverse neoplasie solide, come il tumore del polmone (dove risulta associata al fumo di sigaretta), il tumore del colon retto e

\ il tumore del pancreas⁶⁹. Le mutazioni missenso con guadagno di funzione (*gain-of-function*) sono le principali responsabili della trasformazione di *KRAS* da protooncogene ad oncogene. La risultante proteina *KRAS* mutata rimane nello stato *KRAS*-GTP, che attiva in maniera costitutiva i *pathway* di trasduzione del segnale a valle, portando alla tumorigenesi.

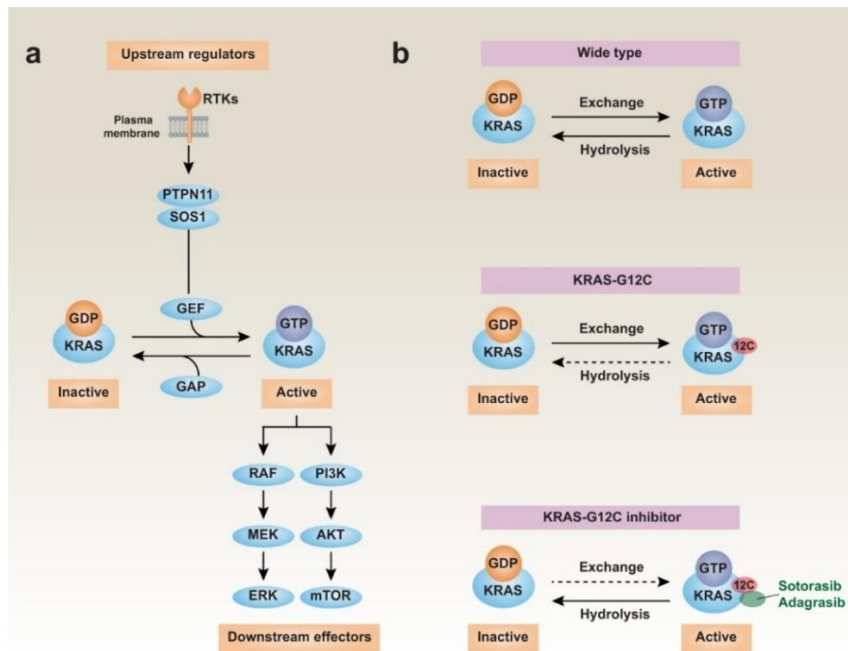


Figura 10. Trasduzione del segnale dell'oncogene *KRAS*. **a)** *KRAS* ha attività GTPasica e può convertire GTP in PIL idrolizzando il gamma fosfato su GTP. Gli stati inattivo e attivo di *KRAS* sono regolati rispettivamente da GAP e GEF. Gli RTK sono il secondo tipo principale di recettori della superficie cellulare con un'ampia gamma di funzioni. La promozione e l'attivazione di *KRAS* attiva molteplici vie di segnale, in particolare le cascate RAF-MEK-ERK e PI3K-AKT-mTOR, deputate rispettivamente alla differenziazione, proliferazione e sopravvivenza cellulare. **b)** Rispetto al *KRAS wild-type*, che mantiene un equilibrio tra stati inattivi e attivati, le mutazioni della cisteina 12 (C12) distruggono l'attività GTPasica di *KRAS*, bloccandolo nello stato legato al GTP. *KRAS* ha attività GTPasica e può convertire GTP in PIL idrolizzando il gamma fosfato su GTP⁷⁰.

Le mutazioni missenso di *KRAS* sono rappresentate prevalentemente da sostituzioni nucleotidiche nei codoni 12, 13 e 61 del gene. Oltre l'80% dei tumori con *KRAS* mutato presenta variazioni a singolo nucleotide nel codone 12. La p.(Gly12Cys) è la mutazione di *KRAS* prevalente nel NSCLC ed è presente in circa il 13% degli adenocarcinomi del polmone; la stessa mutazione è stata osservata nell'1-3% di altri tumori solidi, tra cui quello del colon-retto, del pancreas, endometrio, ovaio, il cancro alla vescica e quello a piccole cellule del polmone. Le mutazioni p.(Gly12Asp) e p.(Gly12Val) di *KRAS* sono invece più

comuni nel carcinoma del colon-retto e nell'adenocarcinoma del pancreas (PDAC), (**Figura 10**)⁶⁸.

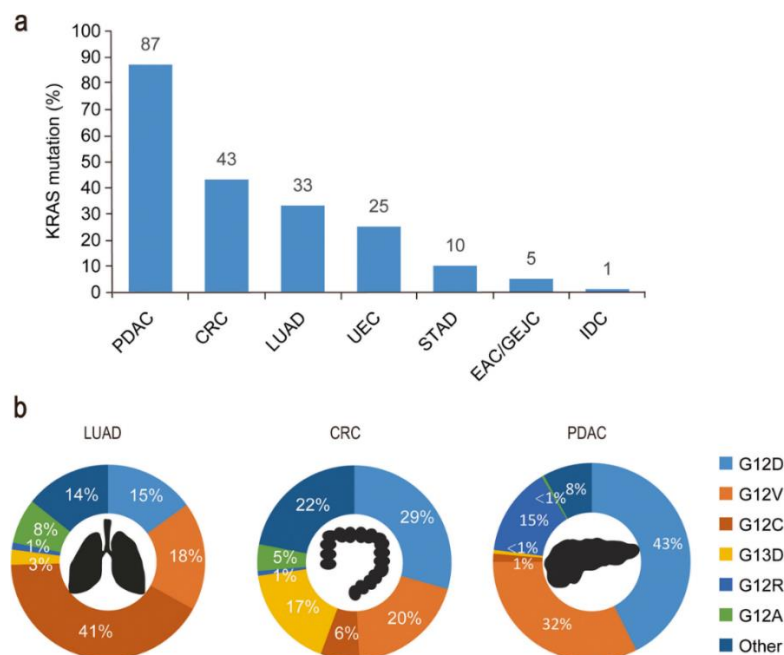


Figura 10. Distribuzione delle mutazioni di *KRAS* nei diversi tumori umani. La mutazione *KRAS* p.(Gly12Cys) si trova nel 41% di adenocarcinoma polmonare (LUAD), mentre *KRAS* p.(Gly12Asp) e *KRAS* p.(Gly12Val) sono le due mutazioni missenso più comuni nel cancro del colon-retto (CRC) e PDAC (adenocarcinoma duttale pancreatico). L'alterazione genetica a livello delle glicine 12 (Gly12) o 13 (Gly13) distrugge l'attività GTPasica di *KRAS* e lo blocca nello stato attivo legato al GTP⁶⁸.

L'alterazione genetica a livello dei codoni 12 e 13 dell'esone 2 del gene *KRAS* distrugge la stabilità dello stato di transizione dell'idrolisi del residuo di arginina, eccezion fatta per la mutazione p.(Gly12Cys), che permette al *KRAS* di continuare a svolgere la sua attività GTPasica e a passare tra lo stato attivo KRas-GTP e lo stato inattivo KRAS-GDP, caratterizzato da una piccola tasca (P2) adiacente al residuo di cisteina in posizione 12 mutato.

Ricerche condotte da *Rosell et al.* hanno evidenziato che *KRAS* guanosina trifosfato idrolasi (GTPasi) regola la segnalazione a valle attraverso l'impegno di effettori con elevata affinità verso la sua conformazione attiva legata al GTP. L'idrolisi del GTP è catalizzata da tre domini chiave all'interno della proteina *KRAS*: il p-loop (residui 10-17), l'interruttore I (residui 30-38) e l'interruttore II (residui 60-76). L'attivazione di *KRAS* è strettamente regolata dal fattore di scambio nucleotidico della guanina SOS1, che promuove lo scambio

di PIL per GTP per attivare il KRAS inattivo legato al PIL. Gli effettori a valle, tra cui le chinasi RAF, PI3K, RALA e RALB tra gli altri, contengono domini di legame KRAS. Le sostituzioni di un singolo amminoacido nel dominio p-loop KRAS GTPasi, come quelle che coinvolgono i residui G12 (D/C/V/R/A/S) o G13 (D/C/V), determinano l'attivazione costitutiva dell'oncoproteina KRAS ostacolando la sua capacità di idrolizzare GTP⁷¹.

Le alterazioni dell'oncogene *KRAS* sono state considerate per lungo tempo “*undruggable*”, cioè impossibili da colpire con una terapia farmacologica mirata. Negli ultimi anni, tuttavia, c'è stato un significativo progresso nella comprensione della biologia di *KRAS* e dei suoi effettori a valle. Ciò si è tradotto in una moltitudine di importanti studi preclinici e studi clinici che sono attualmente in corso e che sono finalizzati a verificare l'efficacia di nuovi farmaci efficaci per il carcinoma polmonare mutante KRAS. Attualmente sono state scoperte diverse piccole molecole inibitrici in grado di legarsi selettivamente e irreversibilmente alla cisteina 12 nella tasca P2 di KRAS variante p.(Gly12Cys) e di bloccare in tal modo la proteina mutata nel suo stato inattivo KRAS-GDP⁷².

Gli primi inibitori covalenti di KRAS p.G12C sotorasib (noto anche come AMG510) e adagrasib (MRTX849) hanno dimostrato efficacia antitumorale negli studi clinici, culminati poi con l'approvazione della Food and Drug Administration (FDA) statunitense e dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) e la somministrazione in seconda linea nei pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) con mutazione p.(Gly12Cys) di *KRAS* (**Figura 11 e Figura 12**).

2019 World Conference on Lung Cancer

September 7-10, 2019 | Barcelona, Spain

wclc2019.iaslc.com | #WCLC19

Conquering Thoracic Cancers Worldwide

AMG 510—KRAS G12C inhibitor

- KRAS is a GTP-binding protein that links receptor tyrosine kinase activation to intracellular signaling^{1,2}
- Mutation of KRAS favors the GTP-bound active state and constitutive activation of downstream effects (differentiation, proliferation, survival)³
- KRAS*^{G12C} mutation has been identified as an oncogenic driver of tumorigenesis
- KRAS*^{G12C} mutation is found in approximately 13% of lung cancer⁴, 3% of colorectal (CRC)⁵ and appendix cancer, and 1-3% of other solid tumors⁶
- Currently there is no approved therapy targeting this mutation
- AMG 510 is a novel, first in class, small molecule that specifically and irreversibly inhibits *KRAS*^{G12C} by locking it in an inactive GDP-bound state

1. Pisci JA, et al. *Cancer Res*. 2012;72:2457-2467.

2. Ostrom JM, et al. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15:771-785.

3. Ryan MB, et al. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;15:709-720.

4. Blomnick A, et al. *Cancer Genet*. 2016;201:195-198.

5. Neumann J, et al. *Pathol Res Pract*. 2009;205:858-862.

6. Zhou L, et al. *Mol Oncol*. 2016;10:32.

GDP, guanosine diphosphate; GTP, guanosine triphosphate;
 KRAS, Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog;
 KRAS^{G12C}, KRAS protein with a G12C mutation at the protein level.

Figura 11. Sotorasib, inibitore della proteina KRAS p.G12C mutata.

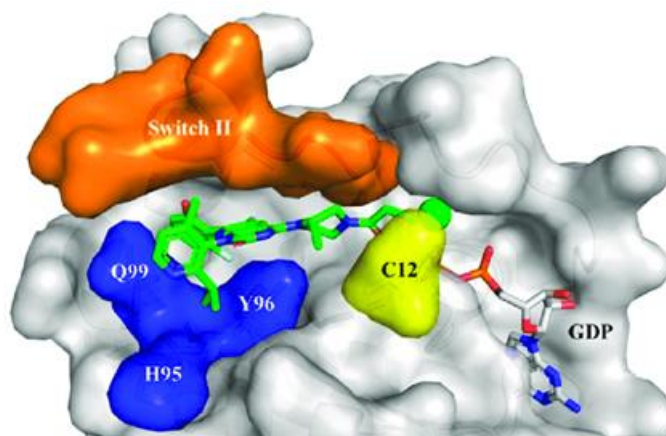


Figura 12. Adagrasib, Inibitore di KRAS G12C, approvato da FDA (Food and drug administration) per la cura dei pazienti NSCLC con mutazione p.(Gly12Cys) di *KRAS*.

Data l'elevata selettività di questi due inibitori verso la proteina KRAS p.(Gly12Cys) mutata, prendere di mira ulteriori mutanti KRAS è una sfida continua che richiederà gli sforzi integrati del potere umano di base, traslazionale e clinico. Dopo aver assistito al potenziale dell'inibizione mirata di KRAS p.(Gly12Cys), le prospettive future di sviluppare ulteriori inibitori di KRAS per altre mutazioni sembrano tuttavia essere un obiettivo più facilmente raggiungibile ⁷³.

Vi è ancora disaccordo riguardo al significato predittivo dello stato mutazionale di KRAS nel NSCLC in stadio iniziale ⁷⁴. In effetti, le attuali linee guida cliniche non raccomandano il test per le mutazioni di KRAS nei casi di NSCLC resecabile, a causa della mancanza di consenso sulle sue implicazioni prognostiche ^{42,75}.

CAPITOLO II

SCOPO DELLA TESI

Il tumore al polmone è una delle principali cause di morte per cancro al mondo, ed il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) ne rappresenta la forma più comune. Specifiche alterazioni molecolari, come le mutazioni nei geni *EGFR* e *KRAS*, stanno assumendo un ruolo chiave nella comprensione e nel trattamento di questa malattia, anche nelle sue fasi iniziali. Tuttavia, si sa ancora poco sulla prevalenza di queste mutazioni nei pazienti con NSCLC resecato nel Sud Italia, poiché il test molecolare di routine per EGFR è stato adottato solo di recente nei casi con istotipo non squamoso in stadio precoce.

Questo studio si propone di descrivere l'epidemiologia delle mutazioni nei geni *EGFR* e *KRAS* nei pazienti con NSCLC operati presso la Fondazione IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza di San Giovanni Rotondo (Puglia) e di analizzare le possibili correlazioni con le caratteristiche dei pazienti e il loro impatto prognostico. I risultati ottenuti, pubblicati nel mese di febbraio 2025 sulla rivista *Cancers*⁷⁶, oltre a rappresentare uno spaccato esclusivo dell'epidemiologia molecolare in Puglia, potrebbe migliorare la comprensione del profilo molecolare del tumore polmonare in questa specifica area geografica e orientare le future ricerche.

CAPITOLO III

MATERIALI E METODI

1. POPOLAZIONE DELLO STUDIO E PARAMETRI CLINICO-PATOLOGICI

Lo studio è stato condotto su un totale di 149 pazienti, arruolati retrospettivamente, con diagnosi di NSCLC in stadio I-IIIa, sottoposti a chirurgia radicale curativa nel periodo compreso tra gennaio 2007 e dicembre 2023 presso il Dipartimento di Chirurgia Toracica e Polmonare dell'Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza di San Giovanni Rotondo (FG), in Puglia, Italia meridionale.

Tutti i pazienti inclusi nello studio sono stati sottoposti a resezione anatomica del parenchima polmonare (lobectomie e segmentectomie) con approccio aperto o minimamente invasivo (VATS o robotico) oppure a resezione atipica⁷⁷. Per tutti i pazienti sono state raccolte informazioni cliniche e patologiche, tra cui la stadiazione Tumor-Node-Metastasis (TNM), l'età alla diagnosi, il tipo di intervento chirurgico, l'istologia e la storia del fumo, e informazioni sul follow up in termini di Progression Free Survival (PFS), Overall survival (OS) e risposta al trattamento, in collaborazione con le Unità di Patologia, Oncologia e Chirurgia Toracica dell'Ospedale.

I pazienti sono stati classificati come "fumatori attivi" se hanno fumato fino a un mese prima della diagnosi, "ex fumatori" se hanno smesso di fumare almeno un mese prima della diagnosi, e "non fumatori" se hanno fumato meno di un pacchetto/anno e non hanno fumato nel mese precedente alla diagnosi. I pazienti arruolati nello studio sono stati trattati secondo la pratica clinica standard, che in Italia segue le linee guida della Società Italiana di Oncologia Medica (AIOM, www.aiom.it).

I risultati clinico-patologici e il materiale biologico utilizzato in questo studio sono stati gestiti in conformità alla Dichiarazione di Helsinki, previa approvazione del Comitato Etico Locale e con il consenso informato di ciascun paziente per lo screening molecolare (n. 89/CE e 171/CE).

2. RACCOLTA DEI CAMPIONI BIOLOGICI

Tutto il materiale biologico analizzato è stato opportunamente selezionato presso il Reparto di Anatomia Patologica dell'Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza.

In particolare, sono stati raccolti un totale di 149 campioni di tessuto tumorale NSCLC provenienti esclusivamente dai siti primari e chirurgicamente asportati, fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE, *Formalin Fixed Paraffin Embedded*).

Tutti i casi sono stati sottoposti a revisione istopatologica da parte di due patologi esperti (P.P. e P.G.), seguendo l'attuale classificazione dei Tumori dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) dell'IARC (<https://publications.iarc.fr>), e per ciascun paziente è stato selezionato un blocco di tessuto tumorale rappresentativo della neoplasia per l'estrazione del DNA e per le successive analisi molecolari.

3. ANALISI MOLECOLARE

3.1 Estrazione del DNA

I tessuti dai quali estrarre il DNA sono stati tagliati al microtomo presso l'Anatomia Patologica dell'Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza per ottenere delle sezioni che, dopo colorazione con ematossilina-eosina, sono state sottoposte ad un'attenta analisi al microscopio ottico. Questa operazione è risultata necessaria per individuare e selezionare l'area del vetrino contenente le cellule tumorali e scartare eventuale tessuto necrotico, flogistico e sano, ove possibile. Sono stati inclusi nello studio i casi di tessuto tumorale aventi una percentuale di cellule neoplastiche >50%.

Per ciascun campione di tessuto paraffinato sono state preparate un minimo di 3 sezioni da 10 µm, che sono state poi microdissecate mediante un bisturi sterile, per eliminare la parte di tessuto sano, non utile ai fini dell'analisi molecolare da eseguire.

Il DNA è stato estratto utilizzando il kit commerciale GeneRead DNA FFPE (Qiagen), allo scopo di ottenere una buona resa a partire da piccole quantità di materiale FFPE. Il kit sfrutta infatti una nuova chimica per la purificazione del DNA per campioni di tessuto paraffinato in grado di ridurre gli artefatti relativi al sequenziamento enzimatico risultanti dalla conservazione e fissazione in formalina. Lunghi periodi di conservazione ed esposizione del materiale in formalina in condizioni non ideali possono contribuire infatti alla transizione delle citosine in timine, le quali costituiscono la gran parte di tali artefatti.

L'area della sezione tumorale contrassegnata dal Patologo è stata grattata dal vetrino mediante l'utilizzo di bisturi e successivamente trasferita in tubo sterile, all'interno del quale sono stati aggiunti 160µL di Deparaffination Solution a 56°C per 3' per eliminare la paraffina. Lo step successivo è consistito nell'aggiungere, per ciascun campione, di una

miscela contenente 25 μ L di Buffer FTB che causa la lisi delle cellule e 20 μ L di Proteinasi K necessaria per la digestione delle proteine. Dopo un'ora di incubazione a 56°C e 90°C, la fase chiara precipitata sul fondo è stata trasferita in un nuovo tubo e posta ad incubare a 50°C per un'altra ora, al termine della sono stati mescolati 115 μ L di Rnase-free water e 35 μ L di UNG (Uracil-N-Glycosilase), un enzima termolabile che elimina il rischio di cross-contaminazioni del DNA. Esso agisce prima del processo di denaturazione e rimuove i polinucleotidi non purinici e anche tutto l'Uracile contaminante.

A tale fase ha fatto seguito una di precipitazione del DNA dove sono stati aggiunti a ciascun campione 2 μ L di RNAsi-A, una endoribonucleasi che degrada specificamente una singola elica di RNA a residui di citosina ed uracile. Infine 250 μ L di BUFFER AL (che consentono l'isolamento del DNA) e 250 μ L di ETANOLO 100% sono stati prima addizionati al tubo e poi tale lisato è stato trasferito su colonna per la successiva purificazione, alla quale è seguito un lavaggio con due Buffer a concentrazioni saline decrescenti (AW1, AW2). Il DNA così purificato è stato eluito aggiungendo 30 μ L di Buffer ATE.

3.2 Analisi qualitativa e quantitativa del DNA

L'analisi qualitativa e quantitativa del DNA estratto è stata effettuata utilizzando il dosaggio fluorimetrico mediante il Qubit dsDNA BR assay Kit (Life Technologies) su fluorimetro Qubit (Thermo Fisher Scientific). Il Qubit (Thermo Fisher) è uno strumento permette di effettuare misure sulla rilevazione della fluorescenza emessa da uno specifico fluorocromo che si lega in modo aspecifico al DNA a doppia elica: la concentrazione viene quindi determinata attraverso una retta di calibrazione ottenuta utilizzando di due standard di DNA a concentrazione nota. Lo strumento prevede l'uso di due differenti kit per l'analisi del DNA (Qubit ds-DNA HS/BR Assay Kit), a seconda dell'intervallo di concentrazione atteso.

Avendo a disposizione discrete quantità di campione FFPE di partenza, il saggio utilizzato in questo studio è stato il dsDNA BR assay (Life Technologies), rapido, altamente selettivo e accurato nella misurazione di concentrazioni di DNA comprese tra i 100 pg/ μ L e i 1000ng/ μ L. Inizialmente è stata preparata la soluzione contenente l'intercalante fluorescente (Qubit® dsDNA BR reagent, 1 μ L per ogni campione) e il Qubit® dsDNA BR buffer (199 μ L per ogni campione). Di ogni campione di DNA genomico precedentemente estratto sono stati prelevati 5 μ L e posti nelle Qubit® assay tube, microtubi forniti con il kit in grado di far passare il fascio luminoso del fluorimetro e permettere in questo modo al fluoroforo legato al DNA di eccitarsi ed emettere la luminescenza nel caso di ibridazione.

I campioni sono stati preparati nel modo seguente: ai 5 μ L di campione contenente il DNA genomico estratto sono stati aggiunti 195 μ L di soluzione contenente il buffer e l'intercalante; successivamente 10 μ L di Qubit® dsDNA BR standard #1 (100ng/ μ L) sono stati addizionati ai 190 μ L di soluzione contenente buffer più l'intercalante ed infine i 10 μ L di Qubit® dsDNA BR standard#2 (100ng/ μ L) sono stati aggiunti a 190 μ L di soluzione contenente buffer e l'intercalante. Prima della lettura dei campioni, il fluorimetro è stato tarato mediante i due standard precedentemente preparati e successivamente si è passati ad analizzare i campioni misurando l'ipotetica quantità di DNA presente espressa in μ g/mL (**Figura 13**).

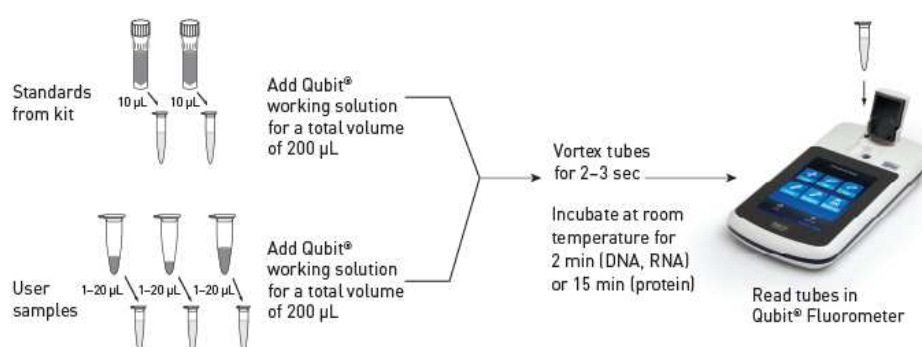


Figura 13. Schema dell'analisi fluorimetrica del DNA tramite fluorimetro Qubit.

3.3 Analisi di mutazione dei geni *KRAS* e *EGFR*

Le mutazioni nei geni *EGFR* e *KRAS* sono state ricercate in ciascun campione biologico utilizzando sia tecniche di sequenziamento (pirosequenziamento e sequenziamento di nuova generazione, NGS) basato su analisi del DNA con piattaforma Ion Torrent (Thermo Fisher), che tecniche hot spot (ddPCR), a seconda della qualità del DNA. Queste ultime prevedono l'identificazione solo di specifiche mutazioni nelle regioni geniche di interesse.

3.3.1 Analisi del DNA mediante analisi di Next-Generation Sequencing (NGS)

La *next generation sequencing* (NGS) è una tecnologia avanzata di sequenziamento degli acidi nucleici che permette di ottenere un elevato *output* (in termini di numero di basi sequenziate) in tempi molto brevi. L'NGS su piattaforma Ion Torrent (ThermoFisher Scientific) prevede quattro fasi fondamentali per l'analisi dei campioni, che sono la fase di preparazione delle librerie, nella quale le regioni genomiche d'interesse vengono dapprima amplificate mediante PCR e quindi usate come filamenti stampo nel processo di preparazione delle librerie; a questa segue la fase di generazione dei *cluster*, il sequenziamento e l'analisi dei dati (**Figura 14**). In aggiunta, la tecnologia Ampli-seq su Ion Torrent prevede una prima fase di amplificazione tramite PCR delle regioni genomiche con peculiarità tali da differenziarla dagli altri sistemi NGS. Semiconduttori come elemento strutturale dei supporti in cui viene dispensato il campione per il sequenziamento (Ion Chip), e l'impiego di un sistema di rilevamento non basato su reazioni luminescenti ma su variazioni di potenziale. Nucleo centrale dell'intero sistema di sequenziamento è l'Ion Chip (**Figura 15**). Esso è costituito da uno strato superficiale superiore, in cui sono ricavati dei pozzetti appositamente strutturati per poter accogliere le *bead* e i reagenti per il sequenziamento. Ciascun pozzetto ha diametro di pochi micron, tale che in esso possa trovare spazio una sola biglia. Questo primo strato superficiale poggia su un secondo costituito da semiconduttori, che permette la trasmissione dei segnali allo strato ancora sottostante.

Quest'ultimo è strutturato come una piastra di sensori, uno corrispondente a ciascun pozzetto, che hanno la capacità di registrare le piccolissime variazioni di pH che avvengono all'interno del pozzetto durante il sequenziamento, trasformandole in differenze di potenziale, ovvero, in dati digitali. Il processo di sequenziamento è caratterizzato da un susseguirsi ciclico sulla superficie del chip di lavaggi e flussi (*flow*) di soluzioni, contenenti ciascuno dei quattro diversi nucleotidi. In questo modo, quando viene dispensato il nucleotide complementare alla prima base libera sul frammento stampo, esso è incorporato alla sequenza nascente.

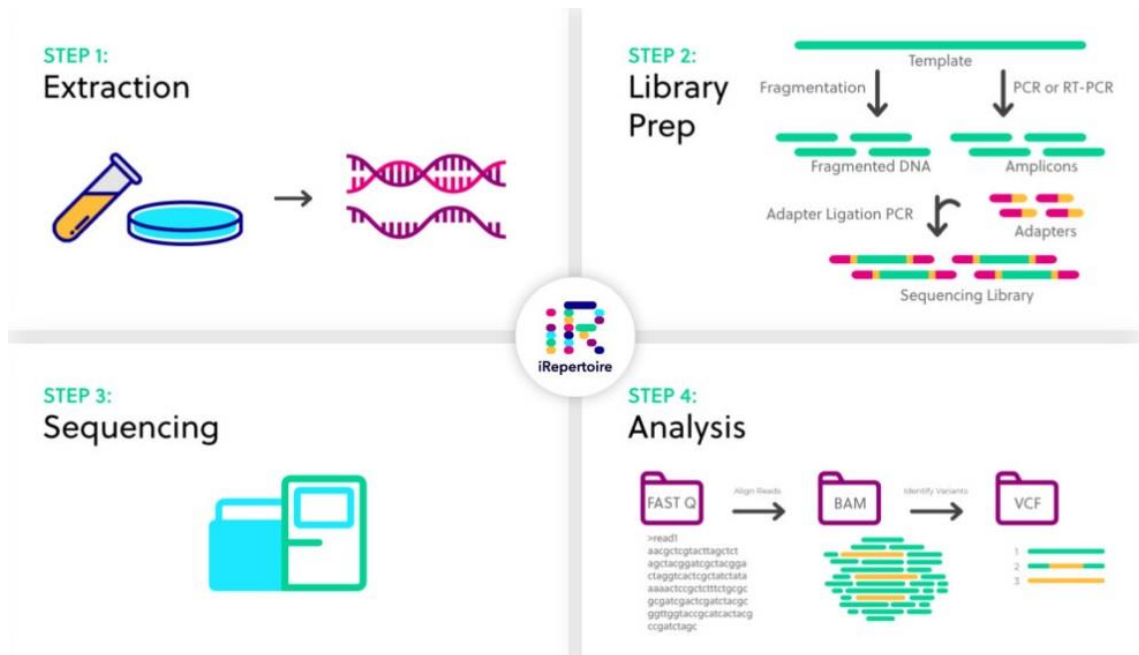


Figura 14. Schema riassuntivo delle diverse fasi della preparazione delle librerie e sequenziamento con tecnologia AmpliSeq su piattaforma IonTorrent (<https://www.thermofisher.com>).

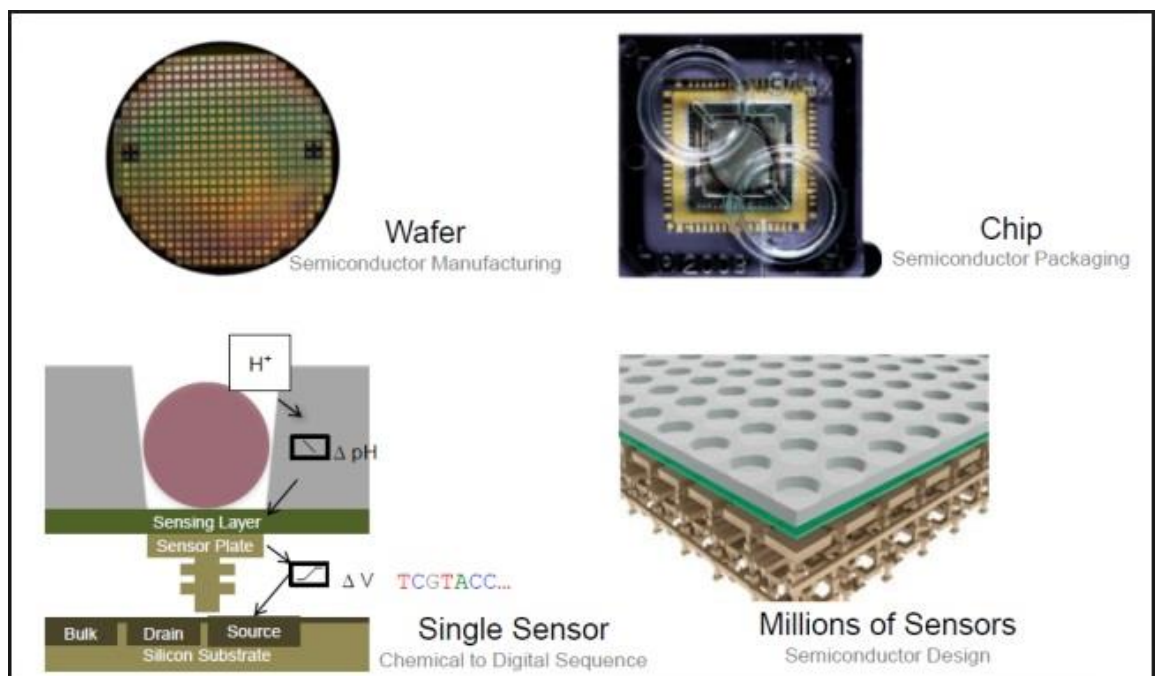


Figura 15. <http://www.genomics.cn/en/>

Poiché la *bead*, su cui è avvenuta l'amplificazione clonale, presenta sulla propria superficie frammenti tutti uguali, il legame della nuova base si verifica contemporaneamente su migliaia di frammenti. La formazione di ogni nuovo legame fosfodiesterico determina l'idrolisi del gruppo trifosfato del nucleotide entrante con la liberazione netta di un protone (H⁺). Il rilascio dei protoni causa l'abbassamento del pH della soluzione presente all'interno del pozzetto; questa variazione viene trasmessa e registrata dal sensore sottostante e digitalizzata. Durante ciascun *flow*, la variazione di pH registrata è direttamente proporzionale al numero delle basi incorporate nella sequenza nascente, e, nel momento in cui la sequenza stampo presenta una zona omopolimerica, l'intensità della variazione di potenziale registrata è tanto superiore quante più sono le basi identiche consecutive. Il vantaggio offerto da questo sistema consiste nella possibilità di introduzione multipla di basi nella sequenza nascente, tuttavia all'aumentare del numero delle basi identiche consecutive, il sistema Ion Torrent mostra una diminuzione di accuratezza nella chiamata delle basi stesse.

Dopo il sequenziamento delle librerie, i dati ottenuti sono fruibili sotto forma di file BAM (*Binary Alignment Map*). Questi file rappresentano la mappa di allineamento multiplo delle sequenze ottenute e vengono automaticamente trasferiti dallo strumento Ion S5 ad un computer abilitato e analizzati sullo Ion ReporterTM Software v5.18 (Thermo Fisher Scientific), utilizzando il *workflow* "colon&lung" per individuare e annotare le variazioni riscontrate nei geni *EGFR* e *KRAS*.

Per la preparazione della libreria NGS e il sequenziamento dei campioni di DNA estratti dalla coorte in studio, un minimo di 30 ng di DNA è stato amplificato utilizzando il pannello Colon and Lung Cancer Research Panel v2 (AmpliseqTM, Life Technologies) e il kit Ion AmpliseqTM Library 2.0. Le librerie ottenute sono state caricate su chip Ion 520TM e sequenziate su Ion Gene Studio S5 (Thermo Fisher Sc.). I dati di sequenziamento sono stati elaborati utilizzando il software standard Ion Torrent Suite in esecuzione su Torrent Server. I dati grezzi del segnale sono stati analizzati mediante la pipeline di Ion Torrent Suite, che include allineamento alla sequenza di riferimento del genoma umano 19 (hg19), controllo di qualità del mapping e analisi della copertura. Dopo l'analisi dei dati, l'annotazione delle varianti a singolo nucleotide, delle inserzioni e delle delezioni è stata eseguita tramite il sistema Ion Reporter Server System (Thermo Fisher Sc.).

3.3.2 Analisi del DNA mediante Droplet Digital PCR

I campioni di DNA risultati inadeguati per l'analisi NGS sono stati analizzati mediante PCR digitale a goccia sul Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad).

Questa tecnica consente di determinare le frazioni relative agli alleli normali e mutati presenti in un campione biologico di DNA utilizzando sonde e primer specifici per la ricerca di precise mutazioni puntiformi (www.bio-rad.com/it). Nello specifico, sono state utilizzati primer e sonde commerciali (www.bio-rad.com/it) per identificare mutazioni nell'esone 2 del gene *KRAS* (codoni 12 e 13) e nel gene *EGFR* (microdelezioni nell'esone 19 e mutazione p.Leu858Arg). Le gocce sono state generate utilizzando un Droplet Generator, quindi amplificate in un termociclatore C1000 Touch™ deepwell (Bio-Rad). Dopo i cicli di amplificazione, la piastra a 96 pozzetti è stata inserita nel lettore QX200 Droplet Reader (Bio-Rad), dove le gocce di ciascun campione sono state analizzate singolarmente e i segnali fluorescenti di ogni goccia sono stati misurati individualmente da un rilevatore. Il sistema QX200 è costituito da due componenti: il Droplet Generator e il Droplet Reader. Il Droplet Generator ha la funzione di ripartire il campione, contenente il DNA target, in 20.000 goccioline delle dimensioni di nanolitri. Tale ripartizione ha la funzione di ridurre la competizione tra le frazioni di DNA mutato e quelle di DNA *wild-type* (wt), aumentando la specificità e la sensibilità dell'analisi. In questo modo l'abbondanza relativa del DNA target viene aumentata.

La Digital PCR prevede una prima fase in cui il campione del DNA in esame viene amplificato. L'amplificato ottenuto viene diluito e portato a bassissime concentrazioni, tali che, attraverso una sua distribuzione su una piastra da amplificazione o su un analogo supporto a pozzetti, possa essere distribuita mediamente una molecola del frammento di DNA amplificato in ciascun pozzetto, dove vengono inoltre dispensati anche tutti i reagenti utili per la reazione di amplificazione. Dopo l'amplificazione, la piastra viene collocata all'interno del QX100 Droplet Reader, il quale è in grado di leggere ciascun pozzetto della piastra indipendentemente. L'analisi quantitativa degli alleli avviene attraverso l'utilizzo di sonde fluorescenti allele-specifiche (FAM per i mutati e HEX per i *wild-type*) che, legandosi specificamente ai frammenti amplificati e opportunamente sollecitate, permettono di evidenziare quanti pozzetti contengano l'allele normale, l'allele mutato, entrambi, o quanti di questi siano vuoti.

I dati sono stati analizzati con il software QuantaSoft versione 1.7.4 (Bio-Rad), mediante la connessione del Droplet Reader e un computer dedicato. Il QuantaSoft fornisce un set completo di strumenti utili per l'impostazione e la denominazione dei campioni, per l'esecuzione e il controllo dello strumento e per l'analisi dei risultati. Esso misura il numero

di *droplet* positive e negative per ciascun fluoroforo di ciascun campione e, inoltre, calcola la frazione di *droplet* positive grazie all’algoritmo di Poisson per determinare la concentrazione di partenza di ciascuna molecola target di DNA per numero di copie/ μ L. Grazie a questo software possiamo trasformare il segnale da analogico a digitale e rilevare, sulla base delle diverse fluorescenze lette per ciascun campione, le gocce prive di DNA, quelle che contengono il DNA *wild-type* e quelle che presentano DNA tumorale. I risultati della ddPCR son infine visualizzati in un grafico monodimensionale, dove l’asse x è relativo al numero degli eventi e l’asse y all’intensità di fluorescenza di ciascuna *droplet* (**Figura 16-pannelloA**).

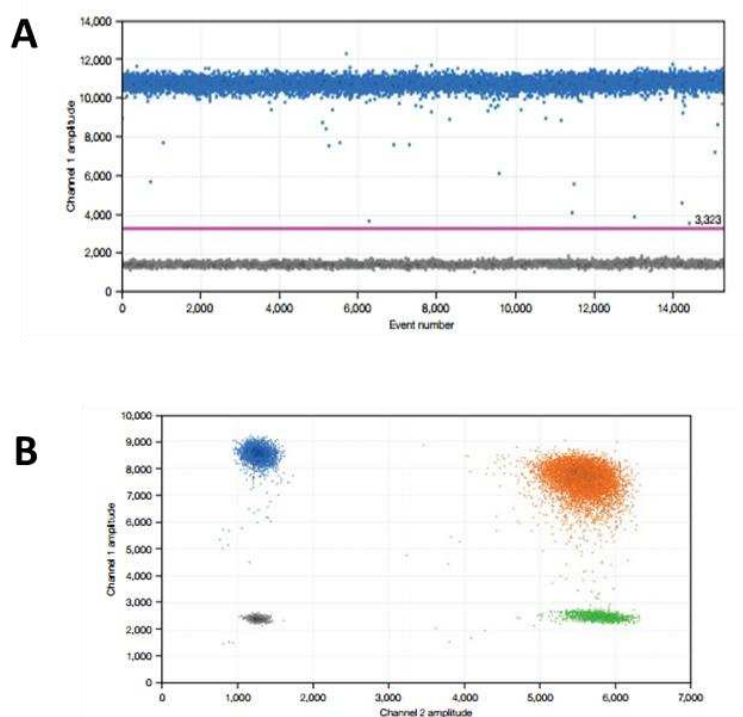


Figura 16. A) Distribuzione di ciascuna *droplet* “plottata” lungo il canale di fluorescenza. B) Plot bidimensionale delle droplet distribuite nei 2 canali di fluorescenza (canale 1 FAM, canale 2 HEX).

Nel grafico bidimensionale vengono interpolati i 2 target (*wild-type* e mutato) derivati dalla reazione di amplificazione distribuiti lungo i 2 canali di fluorescenza (canale 1 indicato con FAM, canale 2 invece con HEX) per ciascuna *droplet*. Poichè la distribuzione del DNA nelle goccioline segue un pattern casuale, la distinzione delle *droplet* avviene in 4 gruppi:

1) FAM negativo ed HEX negativo (*droplet* doppiamente negative, dovute a prodotti non amplificati ed aspecifici quindi senza template) mostrato in grigio nel grafico in basso a sinistra,

2) FAM negativo ed HEX positivo (amplificazione con il solo template *wild-type*) di color verde in basso a destra,

3) FAM positivo ed HEX negativo (*droplet* con il solo template mutato) in blu in alto a sinistra,

4) FAM positivo ed HEX positivo (*droplet* doppiamente positiva con entrambi i template *wild-type* e mutati) di color marrone in alto a destra (**Figura 16-Pannello B**).

3.3.3 Analisi del DNA mediante Pirosequenziamento

Nei campioni negativi, la presenza di una mutazione nel gene *EGFR* è stata valutata utilizzando il kit Therascreen EGFR Pyrosequencing su Pyromark Q24 (Qiagen), allo scopo di verificare la presenza di mutazioni differenti e meno frequenti di quelle ricercate mediante ddPCR.

Il pirosequenziamento è una tecnologia per il sequenziamento di DNA basato sulla sintesi (sequencing-by-synthesis, SBS) in cui la sintesi del DNA viene monitorata in tempo reale attraverso la bioluminescenza. Ogni nucleotide incorporato crea un segnale luminoso che viene registrato e convertito in sequenza nucleotidica. Il pirosequenziamento prevede i seguenti passaggi: 1) frammentazione del DNA da sequenziare; 2) amplificazione attraverso la reazione a catena della polimerasi (polymerase chain reaction, PCR); 3) sequenziamento.

Prima del pirosequenziamento vero e proprio, il DNA da sequenziare viene frammentato e amplificato per creare una libreria di frammenti da sequenziare. Durante la fase di frammentazione il DNA è ridotto in frammenti di 300-800bp e alle estremità vengono ligati degli adattatori (con sequenza nota) di cui uno biotinilato. Questi frammenti di DNA a doppio filamento (dsDNA) vengono denaturati per ottenere DNA a singolo filamento (ssDNA) biotinilati ad una estremità. Questa estremità permette di immobilizzare il filamento a biglie ricoperte di streptavidina, grazie al legame avidina-biotina. In condizioni diluite, ogni biglia è lega un solo frammento di DNA a singolo filamento (**Figura 17-pannelloA**). Il filamento di DNA viene quindi amplificato mediante la *emulsion PCR* (emPCR), in cui la miscela di reazione è emulsionata per separare ogni singola biglia in una goccia di acqua in olio. Le reazioni di pirosequenziamento si basano sulla sintesi, quindi il

filamento di DNA da analizzare funge da stampo per il frammento di Klenow della DNA polimerasi I (Klenow fragment of DNA Polymerase I), (**Figura 17-pannello B**).

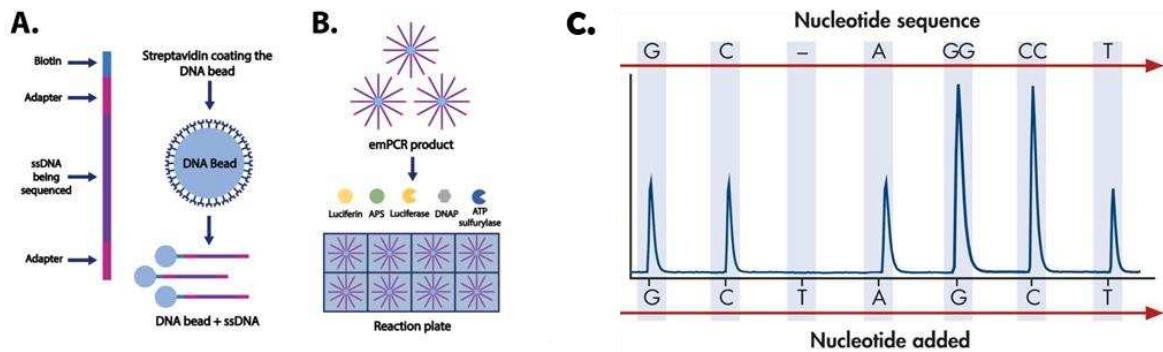


Figura 17. A-B) Preparazione del DNA per il pirosequenziamento [Fonte: apollo-institute.org].
C) Risultato del pirosequenziamento [<https://qiagen.com>]

Questo enzima aggiunge nucleotidi al primer di sequenziamento in modo complementare al filamento stampo, mentre i nucleotidi (dNTPs: adenina dATP α S, timina dTTP, citosina dCTP e guanina dGTP) sono dispensati uno alla volta in modo sequenziale.

Ogni volta che viene aggiunto un nucleotide, se questo è complementare alla sequenza stampo, vengono ripetute le seguenti reazioni (**Figura 18**):

- Il nucleotide viene incorporato nel filamento nascente dal frammento di Klenow e rilascia una molecola di pirofosfato (PPi);
- Il pirofosfato è utilizzato dall'enzima ATP sulfurilasi (ATP sulfurylase) per produrre ATP in modo equimolare;
- L'ATP è utilizzato dalla luciferasi (luciferase) per ossidare la luciferina ed emettere luce;
- L'apirasi (apyrase) rimuove i nucleotidi non incorporati e l'ATP residuo.

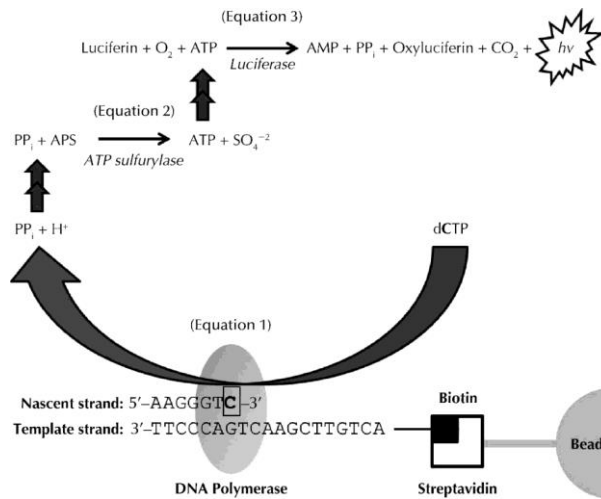


Figura 18. Reazioni del pirosequenziamento⁷⁸

Durante il pirosequenziamento, la luce viene registrata da una CCD (*charge coupled device*) camera ed è convertita in un picco di segnale. L'intensità del segnale è proporzionale al numero di nucleotidi identici incorporati, perché sono incorporati nello stesso step di sequenziamento. La sequenza di DNA può essere determinata dallo schema di luce che risulta dalla aggiunta dei nucleotidi in sequenza nella camera di reazione. In sintesi, si genera un pirogramma che un software specifico converte in sequenza nucleotidica (**Figura 17-pannelloC**).

3.4 ANALISI STATISTICA

Le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti saranno riportate come mediane o in frequenza e percentuale per le variabili categoriali. Il tempo alla progressione (*progression-free survival*, PFS) sarà definito come il periodo di tempo senza malattia tra la data della diagnosi e il primo evento di progressione. Il tempo di sopravvivenza globale (*overall survival*, OS) sarà definito come il tempo tra l'intervento chirurgico e il decesso. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software R versione 4.3.0. Le curve di sopravvivenza sono state stimate con il metodo Kaplan-Meier tramite la funzione `survfit()` del pacchetto `survival` (versione 3.5). Il p-value per il confronto tra i gruppi nelle curve di sopravvivenza è stato calcolato con il test log-rank, eseguito automaticamente tramite la funzione `ggsurvplot()` del pacchetto `survminer` (versione 0.4.9). I confronti tra i gruppi per EGFR e KRAS sono stati effettuati utilizzando il pacchetto `gtsummary` (versione 1.7.2) con la funzione `tbl_summary()`, applicando il test t o il test chi-quadro per i confronti intergruppo.

CAPITOLO IV

RISULTATI

1. Coorte di pazienti

Tutti i pazienti arruolati nello studio provengono dal Sud Italia, in particolare dalla Regione Puglia. Di questi, 114 dei 149 sono maschi (77%), con un'età media di 67 anni (intervallo 40-85). La maggior parte dei casi (124, 83%) riguarda individui con più di 60 anni. Solo il 25% (37 casi) non ha mai fumato, mentre il 37% (55 casi) sono ex fumatori e il 38% (57 casi) erano fumatori attuali.

Tutti i campioni biologici dei pazienti sono stati ottenuti dai tumori primari dopo la resezione chirurgica mediante resezione anatomica del parenchima polmonare (lobectomie e segmentectomie) con un approccio aperto o minimamente invasivo (VATS o robotico) o resezione atipica. Ottantatré su 149 tumori polmonari (83%) sono adenocarcinomi polmonari primari, il 13% (19/149) sono carcinomi polmonari a cellule squamose e il restante 4,7% (7/149) ha un istotipo misto o altro NSCLC (**Tabella 1**).

Tabella 1. Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti NSCLC inclusi nello studio (n=149).

Età alla diagnosi (media ± DS)	67,8 ± 8,8
Sesso	
- Femmina	35 (23%)
- Maschio	114 (77%)
Tipo di intervento chirurgico	
- Resezione anatomica*	109 (73%)
- Resezione atipica	40 (27%)
Margine di resezione (R)	
- R0	144 (97%)
- R1	5 (3,4%)
Metodologia	
- Hot spot	66 (44%)
- Sequenziamento	83 (56%)

Abitudine al fumo	
- Non fumatore	37 (25%)
- Fumatore	112 (75%)
Abitudine al fumo (dettagliata)	
- Non fumatore	37 (25%)
- Ex fumatore	55 (37%)
- Fumatore attuale	57 (38%)
Tipo istologico	
- Adenocarcinoma (ADC)	123 (83%)
- Carcinoma squamoso (SqCC)	19 (13%)
- Carcinoma adenosquamoso (ASC)	3 (2,0%)
- Altro	4 (2,7%)
Stadio UICC	
- I (A-B)	82 (55%)
- II (A-B)	39 (26%)
- IIIA	28 (19%)

Dati espressi come media \pm deviazione standard (DS) o frequenza (%).

R: stato dei margini di resezione; ADC: adenocarcinoma; SqCC: carcinoma a cellule squamose; ASC: carcinoma adenosquamoso; UICC: Union for International Cancer Control.

Le mutazioni di *EGFR* e *KRAS* sono state determinate in tutti i pazienti e si è visto essere distribuite in modo non uniforme tra gli stadi TNM dell'8a edizione, con un numero inferiore di pazienti nello stadio IIA (4,7%) e un numero maggiore negli stadi IA e IB (28,9% e 26,2%), IIB (21,5%) e IIIA (18,8%).

2. Distribuzione delle mutazioni di *EGFR* nei pazienti con NSCLC in stadio iniziale di malattia

Un totale del 16% (24/149) dei pazienti presenta una mutazione di *EGFR*, con prevalenza negli stadi IB (38%), IA (21%) e IIB (29%) (**Tabella 2 e Figura 18**).

Tabella 2. Distribuzione delle mutazioni nei geni *EGFR* e *KRAS* nei pazienti con diversi stadi del carcinoma polmonare secondo il TNM.

Stadio della malattia	Totale casi n=149	EGFR-mutato n=24	KRAS-mutato n=47
Stadio IA	43 (29%)	5 (21%)	14 (30%)
Stadio IB	39 (26%)	9 (38%)	14 (30%)
Stadio IIA	7 (5%)	1 (4%)	0 (0%)
Stadio IIB	32 (21%)	7 (29%)	7 (15%)
Stadio IIIA	28 (19%)	3 (13%)	12 (26%)

I pazienti con mutazioni di *EGFR* (16%) mostrano una frequenza simile di mutazioni nell'esone 21 (46%) e nell'esone 19 (46%), mentre una piccola porzione di pazienti presentava mutazioni nell'esone 20 (8%), (**Figura 19**).

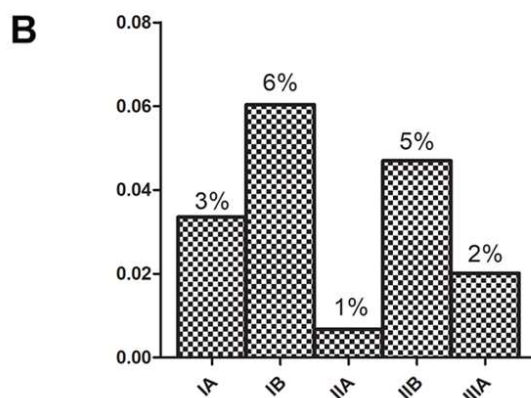
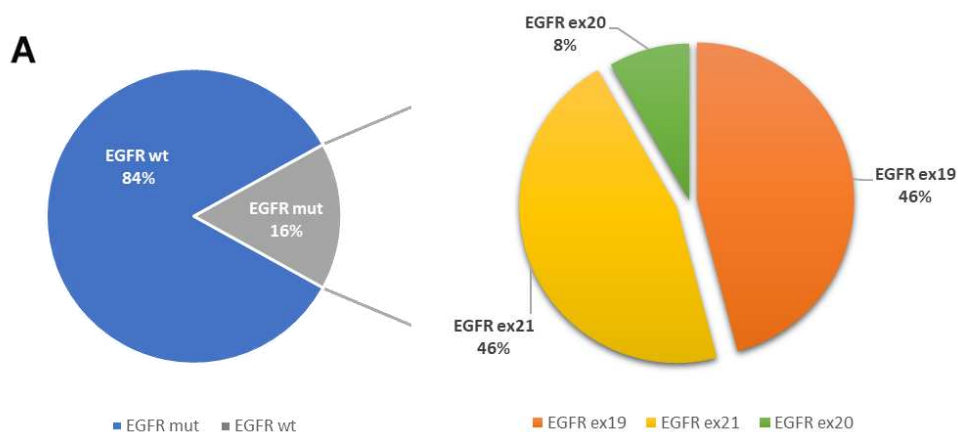


Figura 19. Prevalenza e sottotipi delle mutazioni del gene *EGFR* nelle diverse fasi della malattia del NSCLC. A) Prevalenza dei casi mutati per *EGFR* nelle fasi TNM (8^a edizione); B) Distribuzione delle diverse mutazioni di *EGFR* identificate in tutti i campioni chirurgici.

Le caratteristiche del gruppo di pazienti con mutazioni di *EGFR* sono riportate nella **Tabella 3**. Abbiamo quindi confrontato parametri clinici, molecolari e istologici tra i gruppi di pazienti (**Tabella 4**). Le mutazioni di *EGFR* sono più frequenti nelle donne rispetto agli uomini ($p < 0,001$) e nei pazienti non fumatori ($p < 0,001$), ma sono distribuite casualmente tra le fasi della malattia. L'83% (20/24) delle mutazioni è stato identificato utilizzando una metodologia di sequenziamento, che ha permesso una caratterizzazione più precisa del tipo di mutazione a livello di singolo nucleotide.

Tabella 3. Mutazioni del gene *EGFR* identificate e caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti NSCLC.

ID sample	Sesso	Tipo di chirurgia	Tipo Istologico	Stadio UICC	Età alla diagnosi	Rapporto col fumo	<i>EGFR</i> (nt change)	<i>EGFR</i> (aa change)	<i>EGFR</i> Localizzazione esonica
CSS-4	M	Lobectomia	SqCC	IIB	75	ex fumatore	microdelezione*	non definita*	19
CSS-5	M	Lobectomia	ADC	IA2	68	ex fumatore	c.2235_2248del	p.(Glu746_Ala750del)	19
CSS-33	M	Lobectomia	ADC	IB	70	ex fumatore	c.2543 C>T	p.(Pro848Val)	21
CSS-39	F	Lobectomia	ADC	IIA	57	fumatore	microdelezione*	non definita*	19
CSS-43	F	Lobectomia	ADC	IA3	64	non fumatore	c.T2573G	p.(Leu858Arg)	21
CSS-45	F	Resezione atipica	ADC	IB	68	non fumatore	c.T2573G	p.(Leu858Arg)	21
CSS-46	M	Lobectomia	ADC	IB	78	non fumatore	c.T2573G	p.(Leu858Arg)	21
CSS-61	M	Lobectomia	ADC	IIB	52	non fumatore	c.2237_2255del	p.(Gly746_752 del InsVal)	19
CSS-83	F	Lobectomia	ADC	IIIA	59	non fumatore	c.2235_2249del	p.(Glu746_Ala750del)	19
CSS-84	F	Lobectomia	ADC	IIIA	63	fumatore	c.2239_2248del10insC	p.(Leu747_Ala750delinsPro)	19
CSS-86	F	Lobectomia	ADC	IB	64	non fumatore	c.2573T>C	p.(Leu858Arg)	21
CSS-89	M	Resezione atipica	ADC	IB	70	ex fumatore	c.2573T>C	p.(Leu858Arg)	21
CSS-101	M	Lobectomia	ADC	IIIA	69	ex fumatore	c.2235_2248del	p.(Glu746_Ala750del)	19
CSS-104	F	Segmentectomia	ADC	IA2	69	non fumatore	c.2573 T>G	p.(Lys858Arg)	21
CSS-108	F	Resezione atipica	ADC	IB	81	non fumatore	c.2573 T>G	p.(Lys858Arg)	21

CSS-113	M	Lobectomia	ADC	IIB	76	non fumatore	c.2235_2250	p.(Glu746_Ala750)	21
CSS-124	F	Lobectomia	ADC	IIB	78	non fumatore	c.2236_2237ins18	p.(Ile740_Pro741insProValAlaLysVal)	19
CSS-134	F	Resezione atipica	ADC	IA	72	non fumatore	c.2237_2255delinsT	p.(Glu746Ser752delinsVal)	19
CSS-137	F	Resezione atipica	ADC	IB	58	non fumatore	c.2239_2240delinsCC	p.(Leu747Pro)	19
CSS-139	F	Lobectomia	ADC	IIIA	61	fumatore	c.2319_2323insCAC	p.(Pro772_His773insHis)	20
CSS-142	F	Resezione atipica	ADC	IA2	73	non fumatore	c.2239_2248del10insC	p.(Leu747_Ala750delInsPro)	19
CSS-148	F	Segmentectomia	ADC	IB	72	non fumatore	c. 2582T>A	p.(Leu861Gln)	21
CSS-149	M	Lobectomia	ADC	IIB	64	ex fumatore	c.2573T>C	p.(Leu858Arg)	21
CSS-151	M	Resezione atipica	ADC	IB	70	ex fumatore	c.2573T>C	p.(Leu858Arg)	21

*il kit utilizzato non permetteva di discriminare tra le multiple microdelezioni dell'esone 19 di *EGFR*; ADC, adenocarcinoma; SqCC, Carcioma Squamoso; nt, nucleotide; aa, amminoacido; ins, inserzione; del, delezione; UICC, Union for International Cancer

Tabella 4. Distribuzione delle mutazioni di *EGFR* in base alle caratteristiche dei pazienti.

	Totale (n=149)	EGFR wt1 (n=125)	EGFR mut2 (n=24)	p-value
Età alla diagnosi (mm±SD)	67,8 ±8,8	67,7 ±8,9	68,4 ±7,9	0,73
Sesso				<0,001
Femmina	35 (23%)	20 (16%)	15 (63%)	
Maschio	114 (77%)	105 (84%)	9 (38%)	
Tipo di Chirurgia				0,78
Resezione anatomica*	109 (73%)	92 (74%)	17 (71%)	
Resezione atipica	40 (27%)	33 (26%)	7 (29%)	
R				0,81
0	144 (97%)	121 (97%)	23 (96%)	
1	5 (3,4%)	4 (3,2%)	1 (4,2%)	
Metodologia				<0,001
Hot spot	66 (44%)	62 (50%)	4 (17%)	
Sequenziamento	83 (56%)	63 (50%)	20 (83%)	
Stato Fumatori				<0,001
Mai fumato	37 (25%)	22 (18%)	15 (63%)	
Fumatore	112 (75%)	103 (82%)	9 (38%)	
Stato Fumatori (dettagliato)				<0,001
Mai fumato	37 (25%)	22 (18%)	15 (63%)	
Ex-fumatore	55 (37%)	49 (39%)	6 (25%)	
Fumatore attuale	57 (38%)	54 (43%)	3 (13%)	
Tipo Istologico				0,31
ADC	123 (83%)	100 (80%)	23 (96%)	
SqCC	19 (13%)	18 (14%)	1 (4,2%)	
ADC-SqCC misto	3 (2,0%)	3 (2,4%)	0 (0%)	
Altro	4 (2,7%)	4 (3,2%)	0 (0%)	

	Totale (n=149)	EGFR wt1 (n=125)	EGFR mut2 (n=24)	p-value
Stadio UICC**				0,92
I (A-B)	82 (55%)	69 (55%)	13 (54%)	
II (A-B)	39 (26%)	32 (26%)	7 (29%)	
IIIA	28 (19%)	24 (19%)	4 (17%)	

Mediana +/- SD o Frequenza (%)

Test t a due campioni; Test chi-quadrato di Pearson

*Lobectomy, segmentectomy, pneumonectomy

ADC, adenocarcinoma; SqCC, carcinoma a cellule squamose

¹EGFR wt, tipo selvatico EGFR; ²EGFR mut, EGFR mutato

3. Distribuzione delle mutazioni del gene *KRAS* nei pazienti con NSCLC in stadio iniziale di malattia

Un totale del 31,5% (47/149) dei pazienti presenta una mutazione nel gene *KRAS*, più frequente nelle fasi IA (30%) e IB (30%), (**Tabella 2 e Figura 20**). Le caratteristiche del gruppo di pazienti con mutazione di *KRAS* sono riportate nella **Tabella 5**. Le mutazioni *KRAS* risultano distribuite casualmente tra le fasi della malattia, ma sono più frequenti nel tipo istologico SqCC rispetto all'ADC ($p < 0,03$). L'approccio con metodologia di sequenziamento ha permesso di identificare più mutazioni *KRAS* rispetto all'approccio hotspot (**Tabella 6**). Il sottotipo più comune è risultato essere la mutazione p.(Gly12Cys al 32%, seguito da p.Gly12Val (28%) e p.Gly12Asp (17%), (**Figura 20A**).

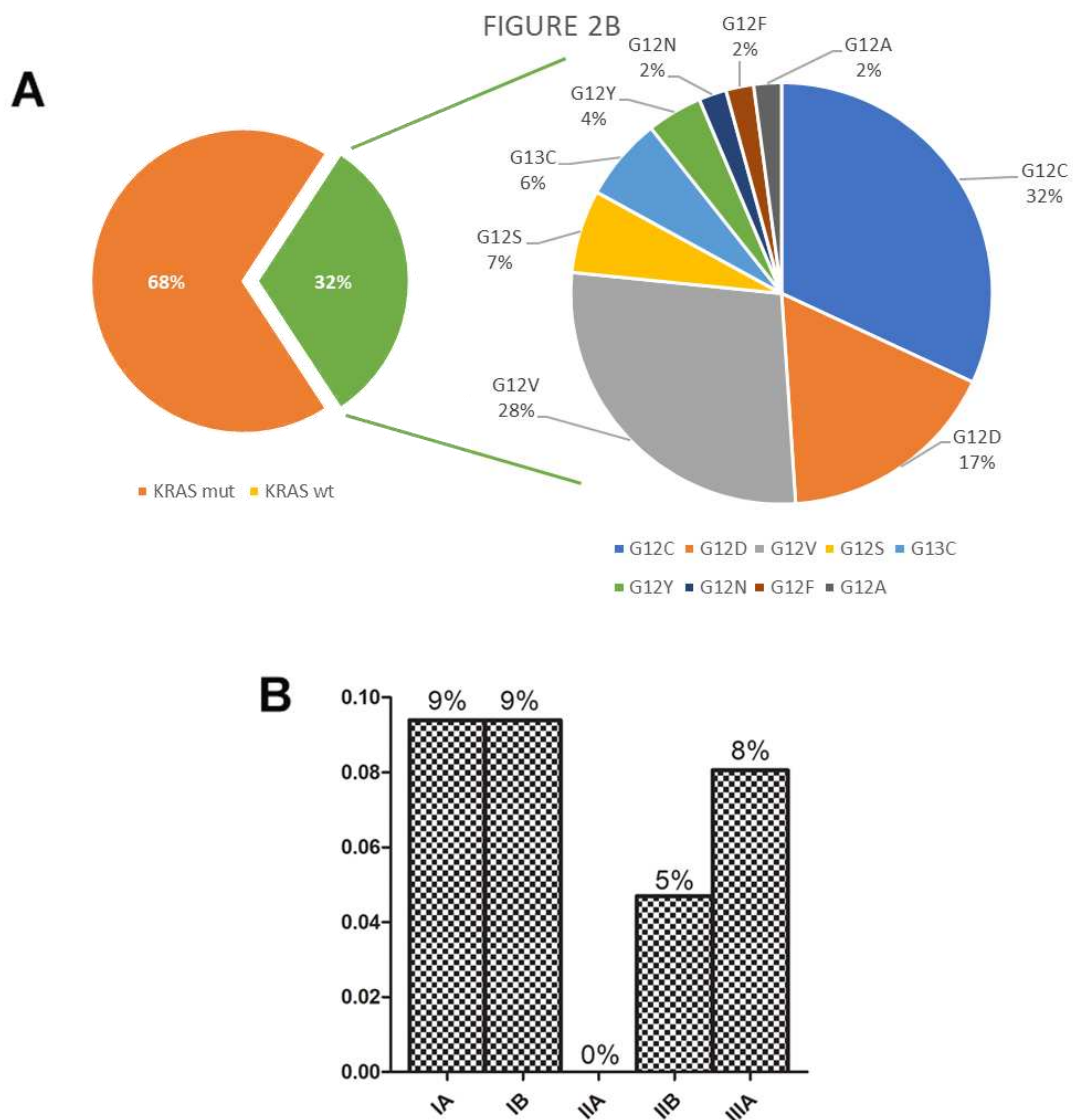


Figura 20. A) Prevalenza delle mutazioni *KRAS* e sottotipi nelle diverse fasi della malattia del NSCLC. Prevalenza dei casi mutati *KRAS* nelle fasi TNM (8ª edizione TNM); **B)** Distribuzione delle diverse mutazioni *KRAS* identificate in tutti i campioni chirurgici.

Tabella 5. Mutazioni del gene *KRAS* identificate e caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti NSCLC.

ID campione	Sesso	Tipo di Chirurgia	Tipo Istologico	Stadio UICC	Età alla Diagnosi	Rapporto con il fumo	<i>KRAS</i> (nt mutato)	<i>KRAS</i> (aa mutato)	Cambio aa (abbreviazione)
CSS-3	M	Lobectomia	LCLC	IIB	53	ex fumatore	c.35G>T	p.(Gly12Val)	p.G12V
CSS-11	F	Resezione atipica	ADC	IB	56	fumatore	c.35 G>A	p.(Gly12Asp)	p.G12D
CSS-16	M	Lobectomia	ADC	IB	65	fumatore	c.34G>T	p.(Gly12Cys)	p.G12C
CSS-18	M	Lobectomia	ADC	IIB	65	ex fumatore	c.35G>A	p.(Gly12Asp)	p.G12D
CSS-21	M	Lobectomia	ADC	IB	71	fumatore	c.37G>T	p. (Gly13Cys)	p.G13C
CSS-24	M	Lobectomia	ADC	IIIA	79	ex fumatore	c.35G>T	p.(Gly12Val)	p.G12V
CSS-30	M	Lobectomia	ADC	IB	65	fumatore	c.34G>T	p.(Gly12Cys)	p.G12C
CSS-35	M	Lobectomia	ADC	IA2	53	ex fumatore	c.35G>T	p.(Gly12Val)	p.G12V
CSS-53	M	Resezione atipica	ADC	IA3	65	fumatore	c.35G>T	p.(Gly12Val)	p.G12V
CSS-54	F	Resezione atipica	ADC	IIIA	71	non fumatore	c.35G>A	p.(Gly12Asn)	p.G12N
CSS-58	M	Lobectomia	ADC	IB	62	ex fumatore	c.34G>T	p.(Gly12Cys)	p.G12C
CSS-68	M	Lobectomia	ADC	IA	60	ex fumatore	c.35G>T	p.(Gly12Asp)	p.G12D
CSS-69	M	Lobectomia	ADC	IB	63	fumatore	c.34G>T	p.(Gly12Cys)	p.G12C
CSS-70	M	Lobectomia	SqCC	IB	77	fumatore	c.34G>T	p.(Gly12Cys)	p.G12C
CSS-73	M	Segmentectomia	ADC	IA3	58	fumatore	c.35G>T	p.(Gly12Val)	p.G12V
CSS-74	M	Lobectomia	ADC	IIB	57	ex fumatore	c.35G>T	p.(Gly12Val)	p.G12V
CSS-75	M	Lobectomia	ADC	IIIA	76	ex fumatore	c.35G>C	p.(Gly12Ala)	p.G12A
CSS-77	F	Resezione atipica	ADC	IIIA	83	non fumatore	c.35G>A	p.(Gly12Asp)	p.G12D
CSS-79	M	Lobectomia	ADC	IB	56	fumatore	c.34G>T	p.(Gly12Cy)	p.G12C
CSS-80	M	Lobectomia	ADC	IA2	74	fumatore	c.34G>A	p.(Gly12Ser)	p.G12S
CSS-81	M	Resezione atipica	ADC	IIIA	74	fumatore	c.37G>T	p.(Gly13Cys)	p.G13C
CSS-82	M	Resezione atipica	ADC	IB	64	ex fumatore	c.34G>T	p.(gly12Cys)	p.G12C

CSS-85	M	Lobectomia	ADC	IA3	40	non fumatore	c.35G>A	p.(Gly12Asp)	p.G12D
CSS-88	M	Lobectomia	ADC	IIB	74	ex fumatore	c.34_35delGG	p.(Gly12Tyr)	p.G12Y
CSS-90	M	Lobectomia	ADC	IA3	68	fumatore	c.35G>A	p.(Gly12Asp)	p.G12D
CSS-92	M	Lobectomia	ADC	IB	66	ex fumatore	c.34G>T	p.(Gly12Cys)	p.G12C
CSS-100	M	Lobectomia	ADC	IIB	75	ex fumatore	c.G35>T	p.(Gly12Val)	p.G12V
CSS-103	M	Resezione atipica	ADC	IA	73	non fumatore	c.G35>T	p.(Gly12Val)	p.G12V
CSS-106	M	Lobectomia	ADC	IB	69	ex fumatore	c.G35>T	p.(Gly12Val)	p.G12V
CSS-110	M	Resezione atipica	ADC	IIIA	71	non fumatore	c.35G>A	p.(Gly12Asp)	p.G12V
CSS-112	F	Lobectomia	ADC	IA	79	non fumatore	c.35G>T	p.(Gly12Val)	p.G12V
CSS-115	M	Resezione atipica	ADC	IA3	58	fumatore	c.35G>T	p.(Gly12Val)	p.G12V
CSS-122	M	Lobectomia	ADC	IIIA	68	fumatore	c.34_35delGGinsTT	p.(Gly12Phe)	p.G12F
CSS-125	M	Lobectomia	ADC	IB	69	fumatore	c.34G>T	p.(Gly12Cys)	p.G12C
CSS-127	M	Segmentectomia	ADC	IA2	64	ex fumatore	c.34G>T	p.(Gly12Cys)	p.G12C
CSS-128	F	Segmentectomia	ADC	IIIA	75	fumatore	c.34G>A	p.(Gly12Ser)	p.G12S
CSS-130	M	Lobectomia	ADC	IIIA	62	fumatore	c.35G>T	p.(Gly12Val)	p.G12V
CSS-131	M	Lobectomia	ADC	IA	63	fumatore	c.34G>T	p.(Gly12Cys)	p.G12C
CSS-133	M	Resezione atipica	ADC	IIIA	74	ex fumatore	c.34G>T	p.(Gly13Cys)	p.G13C
CSS-136	M	Resezione atipica	ADC	IB	64	fumatore	c.34G>T	p.(Gly12Cys)	p.G12C
CSS-138	F	Resezione atipica	ADC	IA2	81	ex fumatore	c.34G>T	p.(Gly12Cys)	p.G12C
CSS-140	F	Resezione atipica	ADC	IIIA	83	non fumatore	c.35G>A	p.(Gly12Asp)	p.G12D
CSS-143	M	Lobectomia	ADC	IIB	74	ex fumatore	c.34_35GG>TA	p.(Gly12Tyr)	p.G12Y
CSS-144	F	Lobectomia	ADC	IIB	61	fumatore	c.34G>T	p.(Gly13Cys)	p.G12C
CSS-146	M	Resezione atipica	ADC	IIIA	71	ex fumatore	c.35G>A	p.(Gly12Asp)	p.G12D
CSS-147	M	Lobectomia	ADC	IA2	74	fumatore	c.34G>A	p.(Gly12Ser)	p.G12S
CSS-153	F	Lobectomia	ADC	IB	56	fumatore	c.34G>T	p.(Gly12Cys)	p.G12C

LCLC, carcinoma del polmone a grandi cellule; ADC, adenocarcinoma; SqCC, carcinoma a cellule squamose, ; nt, nucleotide; aa, aminoacido; ins, inserzione; del, delezione; UICC, Union for Cancer Control.

Tabella 6. Distribuzione delle mutazioni di *KRAS* in base alle caratteristiche dei pazienti.

Caratteristica (n%)	Totale (n=149)	KRAS wt (n=102)	KRAS mut (n=47)	p- value
Età alla diagnosi (mm±SD)	67,8 ±8,8	68,2 ±8,8	67,1 ±8,9	0,470
Sesso				0,400
Femmine	35 (23%)	9 (26%)	26 (74%)	
Maschi	114 (77%)	38 (33%)	76 (67%)	
Tipo di Chirurgia				0,580
Resezione anatomica*	109 (73%)	33 (30%)	76 (70%)	
Resezione atipica	40 (27%)	14 (35%)	26 (65%)	
R				0,120
0	144 (97%)	47 (33%)	97 (67%)	
1	5 (3,4%)	0 (0%)	5 (100%)	
Metodologia				0,040
Hot spot	66 (44%)	15 (23%)	51 (77%)	
Sequenziamento	83 (56%)	32 (39%)	51 (61%)	
Stato Fumatori				0,060
Mai fumato	37 (25%)	7 (19%)	30 (81%)	
Fumatore	112 (75%)	40 (36%)	72 (64%)	
Stato Fumatori (dettagliato)				0,130
Mai fumato	37 (25%)	7 (19%)	30 (81%)	
Ex-fumatore	55 (37%)	18 (33%)	37 (67%)	
Fumatore attuale	57 (38%)	22 (39%)	35 (61%)	
Tipo Istologico				0,030
ADC	123 (83%)	44 (36%)	79 (64%)	
SqCC	19 (13%)	1 (5%)	18 (95%)	
ADC-SqCC misto	3 (2,0%)	0 (0%)	3 (100%)	
Altro	4 (2,7%)	2 (50%)	2 (50%)	

Caratteristica (n%)	Totale (n=149)	KRAS wt (n=102)	KRAS mut (n=47)	p- value
Stadio UICC**				0,070
I (A-B)	82 (55%)	28 (34%)	54 (66%)	
II (A-B)	39 (26%)	7 (18%)	32 (82%)	
IIIA	28 (19%)	12 (43%)	16 (57%)	

Mediana +/- SD o Frequenza (%)

Test t a due campioni; Test chi-quadrato di Pearson

*Lobectomia, segmentectomia, pneumonectomia

ADC, adenocarcinoma; SqCC, carcinoma a cellule squamose

1KRAS wt, tipo selvatico KRAS; 2KRAS mut, KRAS mutato

4. Impatto prognostico dello stato di mutazione dei geni *EGFR* e *KRAS*

Per valutare l'impatto prognostico dello stato di mutazione dei geni *EGFR* e *KRAS*, abbiamo analizzato la sopravvivenza globale (OS) nei 149 pazienti, con un follow-up mediano di 8±4,2 anni. I pazienti in stadio I erano 82/149, con un follow-up mediano di 8,5±4,2. Non è stata osservata alcuna associazione tra le mutazioni *EGFR* o *KRAS* e la sopravvivenza globale, né nell'intero gruppo (pazienti in stadio I-IIA) né nei pazienti con malattia limitata agli stadi I (IA-IB), (**Figura 21**).

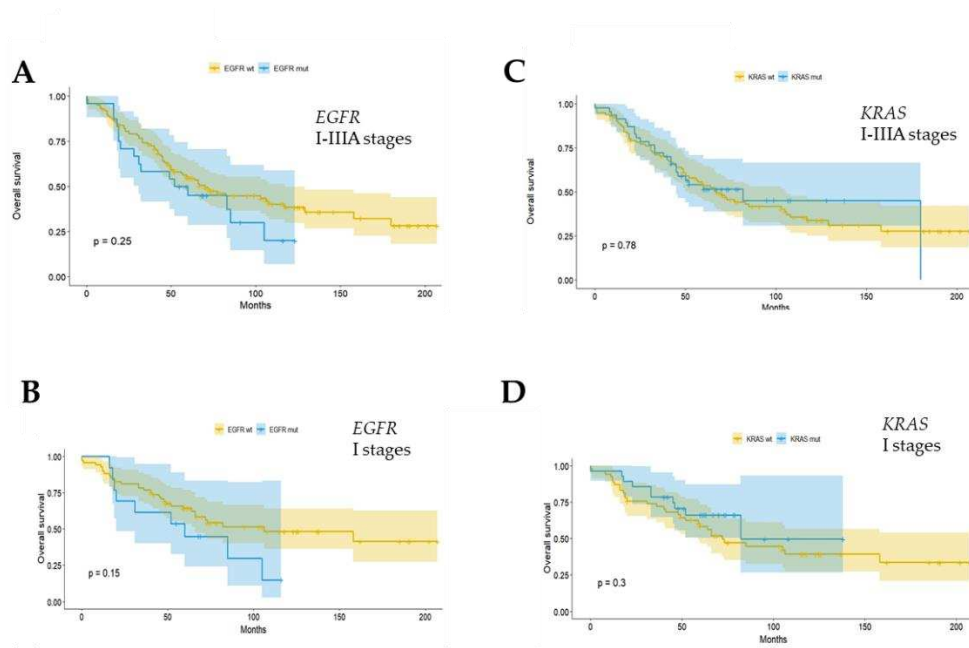


Figura 21. Sopravvivenza globale in tutti i pazienti in base allo stato di mutazione di *EGFR* (A) e *KRAS* (C). Sopravvivenza globale nei pazienti in stadio I in base allo stato di mutazione di *EGFR* (B) e *KRAS* (D). OS, Sopravvivenza globale; *EGFR*, recettore del fattore di crescita epidermico; wt, tipo selvatico; mut, mutato.

5. Valutazione epidemiologica delle mutazioni di *KRAS* ed *EGFR* in Italia e nel Sud Italia

Numerosi studi hanno riportato sia una frequenza variabile che una distribuzione diversa delle alterazioni dei geni *EGFR* e *KRAS* in molte popolazioni, a causa di discrepanze in termini di sensibilità e specificità tra le diverse generazioni di tecnologie di sequenziamento che stanno guadagnando terreno⁷⁹.

Le mutazioni di *EGFR* sono state identificate nel 17% degli ADC in pazienti sottoposti a resezione chirurgica, reclutati e trattati presso la Divisione di Chirurgia Toracica dell'Università di Modena e Reggio Emilia, mentre le mutazioni di *KRAS* sono state riscontrate nel 42% dei pazienti (principalmente p.G12C, p.G12V e p.G12D). Mentre le mutazioni di *EGFR* erano risultavano fortemente correlate allo status di non fumatore ($p = 0,002$) e al sesso femminile ($p = 0,05$), non è stata trovata alcuna correlazione significativa tra la mutazione di *KRAS*, il sesso e l'abitudine al fumo⁸⁰. Infine, nello stesso studio, è riportata una prevalenza di mutazione dell'esone 21 di *EGFR* rispetto alla microdelezione dell'esone 19, in contrasto con quanto comunemente riportato in studi simili, dove è stata

osservata una distribuzione equilibrata delle mutazioni di *EGFR* tra gli esoni 19 e 21 in una coorte più ampia di NSCLC⁸¹.

L'epidemiologia delle mutazioni di *EGFR* e *KRAS* è stata anche studiata da Normanno e Collaboratori, con lo scopo di chiarirne anche l'impatto prognostico. Lo studio è stato condotto su un totale di 3567 pazienti con NSCLC avanzato provenienti dal Sud Italia. Le mutazioni di *EGFR* sono state identificate nel 14,6% dei casi, prevalentemente associate alla istologia adenocarcinoma (15,7%), al sesso femminile (25,2%) e alla condizione di never-smoker (32%). Inoltre, le mutazioni attivanti di *EGFR* identificate si localizzano principalmente nell'esone 19 (9,4%), mentre il 4,6% delle mutazioni si trovano nell'esone 21⁸².

Un'analisi epidemiologica simile è stata effettuata da Rachiglio e Colleghi su una coorte di 133 pazienti con NSCLC avanzato/metastatico reclutati in sette Ospedali del Sud e Centro Italia e trattati con terapia di prima linea con inibitori del TKI dell'*EGFR*. Tutti i pazienti sono stati analizzati per le mutazioni di *EGFR* e *KRAS* mediante sequenziamento di nuova generazione (NGS) basato sull'analisi del DNA e la risultante distribuzione delle mutazioni è stata grossomodo coerente con quelle già riportate. La delezione dell'esone 19 di *EGFR* è stata identificata in 83/133 pazienti (62,4%); 39/133 (29,3%) presentavano la mutazione p.(Leu858Arg), mentre 11/133 (8,3%) altre mutazioni di *EGFR*, con maggiore prevalenza nelle donne (92/133; 69,2%) e nei non fumatori (81/133; 61,4%). Inoltre, sono state rilevate mutazioni di *KRAS* in 14/133 casi, confermando la sua prevalenza rispetto alle mutazioni di *EGFR*⁸³.

Nel 2019 sono stati pubblicati i risultati dello studio di Colombino e colleghi sulle mutazioni dei geni *EGFR* e *KRAS* in più di 1000 casi di ADC polmonare chirurgicamente trattati dal gennaio 2011 al luglio 2016 in Sardegna. I risultati dell'indagine sulle alterazioni molecolari di *EGFR* hanno mostrato un'incidenza simile a quella di altri Paesi caucasici (13%), considerando sia le delezioni dell'esone 19 che la mutazione missenso p.(Leu858Arg), che rappresentavano rispettivamente il 38% e il 29% di tutte le mutazioni osservate, e che sono state identificate principalmente nelle donne e nei soggetti non fumatori⁸⁴. Le mutazioni di *KRAS* sono state, al contrario, identificate negli uomini e nei soggetti fumatori nel 22% dei casi e rappresentano un segno distintivo di esclusività reciproca rispetto alla presenza di mutazioni in *EGFR*. Mutazioni co-occorrenti nei principali geni driver sono state INFATTI identificate solo in pochi casi come possibile meccanismo di resistenza primaria ai farmaci⁸⁴. Analogamente, Passiglia e Colleghi hanno raccolto i dati molecolari e prognostici riguardanti le mutazioni di *KRAS* di pazienti afferenti a 50 divisioni di Oncologia Medica/Patologia di diverse Regioni italiane. I risultati hanno mostrato che le

mutazioni di *KRAS* nei pazienti con NSCLC non squamoso metastatico e in tutte le fasi della malattia non hanno discrepanze significative tra le aree geografiche in termini di frequenza (69% al Nord rispetto al 63% al Sud Italia) ⁸⁵.

Un audit più recente effettuato su 1100 casi di NSCLC avanzato, provenienti dal database ATLAS (che include centri del Sud e del Nord Italia), è stato proposto nel 2024 da Malapelle e Collaboratori con l'obiettivo di chiarire lo scenario epidemiologico di distribuzione e incidenza delle alterazioni genetiche e rivedere l'approccio diagnostico-molecolare per la gestione dei pazienti con NSCLC. In circa il 50% dei pazienti con NSCLC sottoposti a *screening* molecolare, sono state trovate mutazioni in geni farmacologicamente aggredibili, in particolare circa il 14% dei pazienti mostrava mutazioni in *EGFR* e il 26.5% in *KRAS*. I pazienti con mutazioni di *EGFR* appartenevano alla fascia di età compresa tra i 60 e gli 80 anni (66,2%) rispetto agli altri considerati in questo studio, con una preferenza maggiore per i casi femminili (64,5%), l'istologia ADC (91,6%) e i non fumatori (52,1%). La distribuzione delle mutazioni di *KRAS* seguiva invece una distribuzione eterogenea tra i sessi (30,3% femmine vs 69,7% maschi) e le abitudini tabagiche (ex fumatore > 10 p/y nel 52,9%) con una tendenza opposta rispetto a quella delle mutazioni di *EGFR*, sebbene sempre correlati con età avanzata e istologia ADC ⁸⁶.

L'esperienza multicentrica italiana più recente è stata condotta da Pepe e Colleghi, allo scopo di fornire un panorama epidemiologico e molecolare dei biomarcatori predittivi nei pazienti italiani con NSCLC ⁸⁷. In questo studio sono state valutate le prestazioni analitiche dei test molecolari in più di 20 Centri di ricerca/diagnostici italiani (distribuiti diversamente come segue: 58,4% al Nord, 20,8% al Centro e 20,8% al Sud Italia). Le mutazioni hotspot nell'esone 2 (p.Gly12Cys) di *KRAS* e la delezione dell'esone 19 p.(Glu746_Ala750del) di *EGFR* per tutte le istituzioni partecipanti sono state identificate con un'incidenza simile a quella precedentemente riportata. In questo contesto, i ricercatori hanno anche suggerito che l'implementazione di controlli ingegnerizzati (ad esempio, linee cellulari artificiali che presentano alterazioni genomiche) in procedure armonizzate potrebbe rappresentare una soluzione utile per migliorare la sensibilità tecnica e l'efficienza dei flussi di lavoro diagnostici nella pratica preclinica e clinica, indipendentemente dalla diversa distribuzione geografica dei laboratori diagnostici molecolari e genomici ⁸⁷.

CAPITOLO V

DISCUSSIONE

Il panorama del trattamento e della gestione clinica del NSCLC ha subito negli ultimi vent'anni una trasformazione straordinaria, grazie anche ai progressi compiuti nell'ambito degli studi sulle alterazioni molecolari associate alle neoplasie solide. Le mutazioni dei geni *EGFR* e *KRAS* sono state tra le prime ad essere identificate e studiate. Tuttavia, diversi aspetti correlati alla loro patogenicità, in termini di promozione del tumore, ma anche di resistenza ai trattamenti farmacologici mirati, restano ancora da chiarire. Con la recente estensione della terapia target anche agli stadi precoci di tumore polmonare, il quadro ha assunto oggi maggiore complessità, relativa in particolare all'impatto che le alterazioni in geni *driver* dell'NSCLC hanno sull'evoluzione della malattia non metastatica e sulla risposta ai diversi trattamenti.

Lo studio qui descritto rappresenta il primo, a carattere epidemiologico real-life e prognostico, riportato in letteratura sulla distribuzione e il ruolo delle alterazioni dei geni *EGFR* e *KRAS* in pazienti NSCLC in stadio precoce appartenenti all'area geografica della regione Puglia, circoscritta sia geograficamente che geneticamente ⁷⁶. Come risultato dello studio, circa il 48% dei 149 pazienti con NSCLC chirurgicamente resecato e sottoposti ad indagine molecolare hanno mostrato una mutazione nei geni *KRAS* o *EGFR* analizzati.

Tale frequenza appare coerente con i già dati disponibili in letteratura sull'epidemiologia delle mutazioni driver del NSCLC, dove quasi la metà dei pazienti con adenocarcinoma polmonare presenta mutazioni di *EGFR* o *KRAS* ⁸⁸. Tuttavia, rispetto a quanto descritto nelle popolazioni europee, le mutazioni di *EGFR* identificate nella nostra coorte di pazienti sembrano essere più frequenti ^{80,82,83,89-91}, dato quest'ultimo che potrebbe dipendere dalle caratteristiche genetiche del gruppo studiato (circoscritto ai pazienti alla sola regione Puglia).

Le mutazioni di *EGFR* sono state identificate complessivamente nel 16% dei pazienti studiati. Tra queste, le mutazioni nell'esone 21 e nell'esone 19 hanno mostrato un'uguale frequenza pari al 46%, mentre una piccola porzione di pazienti presentava mutazioni nell'esone 20 (8%). La presenza di mutazioni di *EGFR* risulta associata prevalentemente all'istologia adenocarcinoma (ADC) (96%), al sesso femminile (63%) e all'abitudine di non fumare (63%), come appena riportato in molti altri studi di grandi dimensioni ⁹².

Non è emersa alcuna associazione significativa tra le mutazioni di *EGFR* e la sopravvivenza globale dei pazienti, anche solo limitando la valutazione agli stadi I precoci.

Quest'ultimo risultato non invece in linea con i dati di letteratura, dove viene descritta una chiara e forte associazione tra i pazienti con NSCLC resecato in stadio I, una maggiore sopravvivenza globale e una più lunga sopravvivenza libera da progressione di malattia. Questa discrepanza potrebbe essere quindi dovuta alla dimensione ridotta della nostra coorte. Non sono state inoltre indagate le differenze in termini di sopravvivenza globale tra i pazienti con mutazioni p.(Leu858Arg) nell'esone 21 di *EGFR* e quelli con delezioni nell'esone 19, a causa della ridotto numero di pazienti e di mutazioni di *EGFR* identificate.

Le mutazioni di *KRAS* sono state osservate più frequentemente nel carcinoma squamoso (SqCC) (95%), in associate all'abitudine tabagica e in linea con quanto osservato nelle popolazioni precedentemente esaminate⁹³. Tra queste, le mutazioni missenso p.(Gly12Cys), (32%), p.(Gly12Val) (28%) e p.Gly12Asp (17%), con altre mutazioni in nei codoni Gly2 e Gly13 (23%) sono risultate essere le più frequenti, analogamente a quanto già riportato sia nei NSCLC in stadio precoce resecati chirurgicamente che in quelli in stadio avanzato^{80,94}.

La mutazione del gene *KRAS* p.(Gly12Cys) è una mutazione prevalente trovata nel NSCLC, che comporta la sostituzione della cisteina (C) con la glicina (G) nel dodicesimo residuo amminoacidico del gene *KRAS*. Questa alterazione attiva la via di segnalazione RAS/MAPK e stimola il segnale di proliferazione cellulare, favorendo così la crescita e la diffusione delle cellule tumorali⁹⁵. I tumori NSCLC con mutazione di *KRAS* p.(Gly12Cys) presentano caratteristiche clinico-patologiche e genomiche più aggressive rispetto ad altri tumori con mutazioni di *KRAS* differenti e si associano ad una condizione più sfavorevole in termini di sopravvivenza libera da malattia dopo resezione completa di adenocarcinoma polmonare in stadio I-III, una correlazione che non è tuttavia stata indagata nella nostra coorte⁹⁶. Nella coorte di pazienti studiata sono state identificate nove diverse mutazioni di *KRAS* che interessano i codoni 12 e 13 dell'esone 2, tutte già riportate e documentate⁹⁷. Alcune evidenze sembrano indicare che queste diverse sostituzioni amminoacidiche conferiscano alla proteina *KRAS* una differente affinità di legame per le molecole effettrici a valle della cascata cellulare. In particolare, l'analisi *in vitro* su linee cellulari che presentano diversi sottotipi di mutazioni di *KRAS* ha mostrato che le diverse sostituzioni amminoacidiche potrebbero attivare programmi trascrizionali diversi, in grado di influire in maniera differente la prognosi o le vulnerabilità terapeutiche⁹⁸. Nel NSCLC in stadio precoce questo dato è ancora molto frammentato; sebbene diversi studi abbiano mostrato che le mutazioni di *KRAS* influenzano negativamente la prognosi^{99,100}, altri non hanno riportato alcun effetto significativo¹⁰¹, evidenza riportata anche nella nostra coorte.

Fatta salva l'esclusività real-life dei dati riportati, lo studio illustrato ha come limitazione principale la numerosità della coorte analizzata; ciò è dipeso esclusivamente dalla

disponibilità e qualità dei campioni di tessuto a disposizione per l'esecuzione dei test molecolari e dal graduale impiego di tale analisi nella pratica clinica, solo recentemente diffuso. I punti di forza del nostro lavoro, d'altro canto, sono rappresentati dall'unicità della casistica analizzata e riportata e relativa a casi di resezione precoce tratti dalla pratica clinica reale presso la nostra Istituzione e l'omogeneità genetica che li contraddistingue.

Guardando i risultati in una più ampia prospettiva futura, appare chiaro come comprendere la distribuzione e l'interazione delle mutazioni dei geni *EGFR* e *KRAS* nei diversi contesti clinici resti oggi essenziale per sviluppare strategie terapeutiche personalizzate e migliorare l'andamento clinico anche dei pazienti con NSCLC resecato. Le evidenze attuali suggeriscono che le terapie mirate possano essere infatti efficaci nei pazienti con NSCLC resecabile mutato per *EGFR*. Tuttavia, è fondamentale sottolineare che lo *screening* per le mutazioni di *EGFR* nel NSCLC in stadio precoce rappresenta solo il primo passo per migliorare la gestione dei pazienti. Il ruolo della mutazione di *KRAS* nel NSCLC precoce rimane invece ancora in gran parte sconosciuto, supportando l'utilità dello screening di *KRAS* in questo contesto per meglio definirne il significato prognostico e predittivo.

Diverse pubblicazioni evidenziano come il tumore polmonare sia composto da sottogruppi genetici e clinici distinti, ognuno con un comportamento biologico peculiare. Questo dato sottolinea l'importanza della caratterizzazione approfondita del tumore nella pratica clinica e nella ricerca, in ogni fase della malattia. Considerando che l'architettura delle cellule tumorali gioca un ruolo cruciale nella determinazione dell'aggressività della neoplasia, resta fondamentale associare infatti la profilazione molecolare dettagliata alle caratteristiche istopatologiche del tumore per evitare interpretazioni errate dei dati genetici. Nonostante la maggior parte dei dati disponibili riguardi la malattia metastatica, vanno oggi considerati diversi potenziali vantaggi che una valutazione dell'utilità e della fattibilità della profilazione molecolare nei tumori in stadio precoce offre. Tra questi, la maggiore probabilità di ottenere campioni adeguati e l'elevata sensibilità nella rilevazione dei target terapeutici, che potrebbero migliorare l'andamento clinico della malattia. Tuttavia, i tempi di refertazione molto ridotti e la necessità di un coordinamento multidisciplinare rendono la profilazione molecolare del NSCLC nel setting neoadiuvante particolarmente complessa. Tutte le informazioni genetiche e cliniche ottenute dovrebbero poi essere integrate con nuovi strumenti di intelligenza artificiale (AI) che, combinati con la biopsia liquida, consentiranno di ottenere un quadro dinamico della progressione della malattia, sia negli stadi avanzati che in quelli precoci.

L'obiettivo finale è massimizzare l'efficacia terapeutica riducendo al contempo la tossicità e i costi dei trattamenti per i pazienti con NSCLC oncogene-addicted sottoposti a

terapie sistemiche. In questo contesto, l'analisi epidemiologica sottolinea l'importanza di adattare le strategie terapeutiche al panorama genetico del NSCLC, garantendo un'ottimale gestione dei pazienti.

Bibliografia

1. Sung H, others. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209–249.
2. GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data | UICC [Internet]. [cited 2025 Mar 12]; Available from: <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-global-cancer-data>
3. Thai AA, others. Lung cancer. *Lancet* 2021;398(10299):535–554.
4. AIOM-AIRTUM. I numeri del cancro in Italia 2024. 2024.
5. AIOM-AIRTUM. I numeri del cancro in Italia 2023. 2023.
6. Jassem J. Tobacco smoking after diagnosis of cancer: clinical aspects. *Transl Lung Cancer Res* 2019;8(Suppl 1):S50–S58.
7. Comunicato Stampa N°39/2022 - Fumo: in Italia circa 800mila fumatori in più rispetto al 2019. Triplicato il consumo di sigarette a tabacco riscaldato [Internet]. ISS. [cited 2025 Mar 12]; Available from: https://www.iss.it/primo-piano/-/asset_publisher/3f4alMwzN1Z7/content/id/7146126
8. Pleasants RA, others. Both Duration and Pack-Years of Tobacco Smoking Should Be Used for Clinical Practice and Research. *Ann Am Thorac Soc* 2020;17(7):804–806.
9. Caini S, others. Quitting Smoking At or Around Diagnosis Improves the Overall Survival of Lung Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Thorac Oncol* 2022;17(5):623–636.
10. Moorthy B, Chu C, Carlin DJ. Polycyclic aromatic hydrocarbons: from metabolism to lung cancer. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 2015;145(1):5–15.
11. Agraval H, Chu HW. Lung Organoids in Smoking Research: Current Advances and Future Promises. *Biomolecules* 2022;12(10):1463.
12. Marques P, Piqueras L, Sanz M-J. An updated overview of e-cigarette impact on human health. *Respir Res* 2021;22(1):151.

13. Bracken-Clarke D, Kapoor D, Baird AM, et al. Vaping and lung cancer - A review of current data and recommendations. *Lung Cancer Amst Neth* 2021;153:11–20.
14. Auer R, Concha-Lozano N, Jacot-Sadowski I, Cornuz J, Berthet A. Heat-Not-Burn Tobacco Cigarettes: Smoke by Any Other Name. *JAMA Intern Med* 2017;177(7):1050–1052.
15. Bhat TA, Kalathil SG, Leigh N, et al. Acute Effects of Heated Tobacco Product (IQOS) Aerosol Inhalation on Lung Tissue Damage and Inflammatory Changes in the Lungs. *Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob* 2021;23(7):1160–1167.
16. Consonni D, Carugno M, Matteis SD, et al. Outdoor particulate matter (PM10) exposure and lung cancer risk in the EAGLE study. *PLOS ONE* 2018;13(9):e0203539.
17. Kiyohara C, Otsu A, Shirakawa T, Fukuda S, Hopkin JM. Genetic polymorphisms and lung cancer susceptibility: a review. *Lung Cancer Amst Neth* 2002;37(3):241–256.
18. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer* 2005;93(7):825–833.
19. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, et al. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol* 2022;17(3):362–387.
20. Kim CH, Lee Y-CA, Hung RJ, et al. Exposure to secondhand tobacco smoke and lung cancer by histological type: a pooled analysis of the International Lung Cancer Consortium (ILCCO). *Int J Cancer* 2014;135(8):1918–1930.
21. Lau SCM, Pan Y, Velcheti V, Wong KK. Squamous cell lung cancer: Current landscape and future therapeutic options. *Cancer Cell* 2022;40(11):1279–1293.
22. Suarez E, Knollmann-Ritschel BEC. Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Acad Pathol* 2017;4:2374289517705950.
23. Pelosi G, Rindi G, Travis WD, Papotti M. Ki-67 antigen in lung neuroendocrine tumors: unraveling a role in clinical practice. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2014;9(3):273–284.

24. Seguin L, Durandy M, Feral CC. Lung Adenocarcinoma Tumor Origin: A Guide for Personalized Medicine. *Cancers* 2022;14(7):1759.
25. Sharma T, Das P, Panigrahi R, Rao CM, Rath J. Immunocytochemical Evaluation of TTF-1, Napsin-A, and p-63 for Subtyping of Non-Small Cell Lung Carcinoma and Clinicopathological Correlation. *J Cytol* 2022;39(4):180–187.
26. Naidoo J, Santos-Zabala ML, Iyriboz T, et al. Large Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Lung: Clinico-Pathologic Features, Treatment, and Outcomes. *Clin Lung Cancer* 2016;17(5):e121–e129.
27. Andrini E, Marchese PV, De Biase D, et al. Large Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Lung: Current Understanding and Challenges. *J Clin Med* 2022;11(5):1461.
28. Hendifar AE, Marchevsky AM, Tuli R. Neuroendocrine Tumors of the Lung: Current Challenges and Advances in the Diagnosis and Management of Well-Differentiated Disease. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2017;12(3):425–436.
29. Moran CA, Lindholm KE, Brunnström H, et al. Typical and atypical carcinoid tumors of the lung: a clinicopathological correlation of 783 cases with emphasis on histological features. *Hum Pathol* 2020;98:98–109.
30. Kim J, Lee H, Huang BW. Lung Cancer: Diagnosis, Treatment Principles, and Screening. *Am Fam Physician* 2022;105(5):487–494.
31. Nooreldeen R, Bach H. Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis. *Int J Mol Sci* 2021;22(16):8661.
32. Wang M, Herbst RS, Boshoff C. Toward personalized treatment approaches for non-small-cell lung cancer. *Nat Med* 2021;27(8):1345–1356.
33. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest* 2017;151(1):193–203.
34. Lababede O, Meziane MA. The Eighth Edition of TNM Staging of Lung Cancer: Reference Chart and Diagrams. *The Oncologist* 2018;23(7):844–848.

35. Wang S, Yang DM, Rong R, et al. Artificial Intelligence in Lung Cancer Pathology Image Analysis. *Cancers* 2019;11(11):1673.
36. Rami-Porta R. The TNM classification of lung cancer-a historic perspective. *J Thorac Dis* 2024;16(11):8053–8067.
37. Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP), Network Genomic Medicine (NGM). A genomics-based classification of human lung tumors. *Sci Transl Med* 2013;5(209):209ra153.
38. Devarakonda S, Morgensztern D, Govindan R. Genomic alterations in lung adenocarcinoma. *Lancet Oncol* 2015;16(7):e342-351.
39. Trombetta D, Sparaneo A, Fabrizio FP, Di Micco CM, Rossi A, Muscarella LA. NRG1 and NRG2 fusions in non-small cell lung cancer (NSCLC): seven years between lights and shadows. *Expert Opin Ther Targets* 2021;25(10):865–875.
40. Hammerman PS, Lawrence MS, Voet D, et al. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 2012;489(7417):519–525.
41. George J, Lim JS, Jang SJ, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* 2015;524(7563):47–53.
42. LINEE GUIDA NEOPLASIE DEL POLMONE [Internet]. AIOM. 2024 [cited 2025 Mar 12]; Available from: <https://www.aiom.it/linee-guida-aiom-2024-neoplasie-del-polmone/>
43. Colloca G. Performance status as prognostic factor in phase III trials of first-line chemotherapy of unresectable or metastatic pancreatic cancer: A trial-level meta-analysis. *Asia Pac J Clin Oncol* 2022;18(3):232–239.
44. Reck M, Remon J, Hellmann MD. First-Line Immunotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2022;40(6):586–597.
45. Dunne EG, Fick CN, Isbell JM, et al. The Emerging Role of Immunotherapy in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer. *Ann Thorac Surg* 2024;118(1):119–129.

46. Liu S-YM, Zheng M-M, Pan Y, Liu S-Y, Li Y, Wu Y-L. Emerging evidence and treatment paradigm of non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol* 2023;16(1):40.
47. Liu S-Y, Zhang J-T, Zeng K-H, Wu Y-L. Perioperative targeted therapy for oncogene-driven NSCLC. *Lung Cancer Amst Neth* 2022;172:160–169.
48. Tan AC, Tan DSW. Targeted Therapies for Lung Cancer Patients With Oncogenic Driver Molecular Alterations. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2022;40(6):611–625.
49. IASLC Atlas of Molecular Testing for Targeted Therapy in Lung Cancer [Internet]. IASLC. [cited 2025 Mar 12]; Available from: <https://www.iaslc.org/iaslc-atlas-molecular-testing-targeted-therapy-lung-cancer>
50. Michelotti A, Scordilli M de, Bertoli E, De Carlo E, Del Conte A, Bearz A. NSCLC as the Paradigm of Precision Medicine at Its Finest: The Rise of New Druggable Molecular Targets for Advanced Disease. *Int J Mol Sci* 2022;23(12):6748.
51. Herbst RS, Wu Y-L, John T, et al. Adjuvant Osimertinib for Resected EGFR-Mutated Stage IB-III A Non-Small-Cell Lung Cancer: Updated Results From the Phase III Randomized ADAURA Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2023;41(10):1830–1840.
52. Le Chevalier T. Adjuvant chemotherapy for resectable non-small-cell lung cancer: where is it going? *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2010;21 Suppl 7:vii196-198.
53. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* 2018;553(7689):446–454.
54. Wu Y-L, Tsuboi M, He J, et al. Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2020;383(18):1711–1723.
55. Wu Y-L, Dziadziuszko R, Ahn JS, et al. Alectinib in Resected ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2024;390(14):1265–1276.
56. Mitsudomi T. Advances in target therapy for lung cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2010;40(2):101–106.

57. Khaddour K, Jonna S, Deneka A, et al. Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor in EGFR-Mutated Lung Cancer: Current and Emerging Therapies. *Cancers* 2021;13(13):3164.
58. Passaro A, Mok T, Peters S, Popat S, Ahn M-J, Marinis F de. Recent Advances on the Role of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in the Management of NSCLC With Uncommon, Non Exon 20 Insertions, EGFR Mutations. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2021;16(5):764–773.
59. Mitsudomi T, Yatabe Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J* 2010;277(2):301–308.
60. Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 2004;305(5687):1163–1167.
61. Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014;511(7511):543–550.
62. Shi Y, Au JS-K, Thongprasert S, et al. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER). *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2014;9(2):154–162.
63. Ten Berge DMHJ, Aarts MJ, Groen HJM, Aerts JGJV, Kloover JS. A population-based study describing characteristics, survival and the effect of TKI treatment on patients with EGFR mutated stage IV NSCLC in the Netherlands. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990* 2022;165:195–204.
64. Sara Kuruvilla M, Liu G, Syed I, et al. EGFR mutation prevalence, real-world treatment patterns, and outcomes among patients with resected, early-stage, non-small cell lung cancer in Canada. *Lung Cancer Amst Neth* 2022;173:58–66.
65. Liu S-Y, Bao H, Wang Q, et al. Genomic signatures define three subtypes of EGFR-mutant stage II–III non-small-cell lung cancer with distinct adjuvant therapy outcomes. *Nat Commun* 2021;12(1):6450.
66. Batra U, Biswas B, Prabhash K, Krishna MV. Differential clinicopathological features, treatments and outcomes in patients with Exon 19 deletion and Exon 21

- L858R EGFR mutation-positive adenocarcinoma non-small-cell lung cancer. *BMJ Open Respir Res* 2023;10(1):e001492.
67. Buday L, Downward J. Many faces of Ras activation. *Biochim Biophys Acta* 2008;1786(2):178–187.
 68. Zhu C, Guan X, Zhang X, et al. Targeting KRAS mutant cancers: from druggable therapy to drug resistance. *Mol Cancer* 2022;21(1):159.
 69. Bournet B, Buscail C, Muscari F, Cordelier P, Buscail L. Targeting KRAS for diagnosis, prognosis, and treatment of pancreatic cancer: Hopes and realities. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990* 2016;54:75–83.
 70. Liu J, Kang R, Tang D. The KRAS-G12C inhibitor: activity and resistance. *Cancer Gene Ther* 2022;29(7):875–878.
 71. Rosell R, Aguilar A, Pedraz C, Chaib I. KRAS inhibitors, approved. *Nat Cancer* 2021;2(12):1254–1256.
 72. Veluswamy R, Mack PC, Houldsworth J, Elkhoully E, Hirsch FR. KRAS G12C-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Biology, Developmental Therapeutics, and Molecular Testing. *J Mol Diagn JMD* 2021;23(5):507–520.
 73. Singhal A, Li BT, O'Reilly EM. Targeting KRAS in cancer. *Nat Med* 2024;30(4):969–983.
 74. Garinet S, Wang P, Mansuet-Lupo A, Fournel L, Wislez M, Blons H. Updated Prognostic Factors in Localized NSCLC. *Cancers* 2022;14(6):1400.
 75. Remon J, Soria J-C, Peters S, ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer: an update of the ESMO Clinical Practice Guidelines focusing on diagnosis, staging, systemic and local therapy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2021;32(12):1637–1642.
 76. Piazzolla M, Parente P, Centra F, et al. Distribution of EGFR and KRAS Mutations in Patients with Surgically Resected Non-Small Cell Lung Cancer from Southern Italy: Real-Life Data from a Single Institution and Literature Review. *Cancers* 2025;17(5):730.

77. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2014;32(6):579–586.
78. Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137(9):1296–1303.
79. Passiglia F, Calandri M, Guerrera F, et al. Lung Cancer in Italy. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2019;14(12):2046–2052.
80. Casali C, Rossi G, Marchioni A, et al. A single institution-based retrospective study of surgically treated bronchioloalveolar adenocarcinoma of the lung: clinicopathologic analysis, molecular features, and possible pitfalls in routine practice. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2010;5(6):830–836.
81. Marchetti A, Martella C, Felicioni L, et al. *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(4):857–865.
82. Normanno N, Pinto C, Taddei GL, et al. 183P - Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Italian Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Enrolled in the EGFR Fastnet Program. *Ann Oncol* 2012;23:ix78.
83. Rachiglio AM, Fenizia F, Piccirillo MC, et al. The Presence of Concomitant Mutations Affects the Activity of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Patients. *Cancers* 2019;11(3):341.
84. Colombino M, Paliogiannis P, Cossu A, et al. EGFR, KRAS, BRAF, ALK, and cMET genetic alterations in 1440 Sardinian patients with lung adenocarcinoma. *BMC Pulm Med* 2019;19(1):209.
85. Passiglia F, Malapelle U, Del Re M, et al. KRAS inhibition in non-small cell lung cancer: Past failures, new findings and upcoming challenges. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 2020;137:57–68.
86. Malapelle U, Passiglia F, Pepe F, et al. The biomarkers ATLAS: An audit on 1100 non-small cell lung cancer from an Italian knowledge-based database. *Lung Cancer Amst Neth* 2024;191:107787.

87. Pepe F, Russo G, Venuta A, et al. Non-Small Cell Lung Cancer Testing on Reference Specimens: An Italian Multicenter Experience. *Oncol Ther* 2024;12(1):73–95.
88. Friedlaender A, Perol M, Banna GL, Parikh K, Addeo A. Oncogenic alterations in advanced NSCLC: a molecular super-highway. *Biomark Res* 2024;12(1):24.
89. Li R, Li Q, Lin S, et al. Prognostic implication of EGFR mutation status and subtype in resected lung adenocarcinoma patients irrespective of therapy. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex* 2019;21(3):298–303.
90. Auliac J-B, Thomas P-A, Bylicki O, et al. Resected EGFR-mutated non-small-cell lung cancers: incidence and outcomes in a European population (GFPC Exerpos Study). *Ther Adv Med Oncol* 2024;16:17588359241236451.
91. Renaud S, Falcoz P-E, Schaëffer M, et al. Prognostic value of the KRAS G12V mutation in 841 surgically resected Caucasian lung adenocarcinoma cases. *Br J Cancer* 2015;113(8):1206–1215.
92. Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(36):13306–13311.
93. Chapman AM, Sun KY, Ruestow P, Cowan DM, Madl AK. Lung cancer mutation profile of EGFR, ALK, and KRAS: Meta-analysis and comparison of never and ever smokers. *Lung Cancer Amst Neth* 2016;102:122–134.
94. Renaud S, Falcoz P-E, Schaëffer M, et al. Prognostic value of the KRAS G12V mutation in 841 surgically resected Caucasian lung adenocarcinoma cases. *Br J Cancer* 2015;113(8):1206–1215.
95. Skoulidis F, Li BT, Dy GK, et al. Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *N Engl J Med* 2021;384(25):2371–2381.
96. Jones GD, Caso R, Tan KS, et al. KRAS G12C Mutation Is Associated with Increased Risk of Recurrence in Surgically Resected Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2021;27(9):2604–2612.

97. Cosmic. COSMIC - Catalogue of Somatic Mutations in Cancer [Internet]. [cited 2025 Mar 13]; Available from: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
98. Ihle NT, Byers LA, Kim ES, et al. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst* 2012;104(3):228–239.
99. Izar B, Zhou H, Heist RS, et al. The prognostic impact of KRAS, its codon and amino acid specific mutations, on survival in resected stage I lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer* 2014;9(9):1363–1369.
100. Kadota K, Sima CS, Arcila ME, et al. KRAS Mutation Is a Significant Prognostic Factor in Early-stage Lung Adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2016;40(12):1579–1590.
101. Wahl SGF, Dai HY, Emdal EF, et al. The Prognostic Effect of KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Carcinoma Revisited: A Norwegian Multicentre Study. *Cancers* 2021;13(17):4294.

RINGRAZIAMENTI