



**Azienda Ospedaliera Universitaria
Policlinico Paolo Giaccone
di Palermo**



Dottorato di Ricerca in

**Oncopatologia Cellulare e Molecolare Clinica
Ciclo XXIV**

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Fiorentino

**VERSAMENTI PLEURICI MALIGNI: DALLE ANALISI
GENETICHE AL TRATTAMENTO CHIRURGICO.**

Tesi di Dottorato di:

Dott.

D. Catarella

Tutore:

Chiar.mo Prof.

A. Agrusa

Anno Accademico 2010/2011

INDICE

Prefazione

Capitolo I

1.1 Definizione	
1.2 Epidemiologia.....	

Capitolo II

2.1 Diagnosi	
--------------------	--

Capitolo III

3.1 Caratteristiche del Liquido Pleurico	
--	--

Capitolo IV

4.1 Genesi Molecolare	
4.2 Incidenza delle mutazioni	
4.3 Ricerca Genica	

Capitolo V – Tecniche di Sequenziamento:

5.1 Sequenziamento diretto del prodotto della PCR secondo Sanger.	
5.2 Metodo Sanger con primer marcato.....	
5.3 PCRo reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction)...	
5.4 Metodica ARMS (Amplification Refractory Mutation System)	

Capitolo VI – Tecnica di prelievo dei campioni:

6.1 Toracentesi.....

6.2 Vats

6.3 Awake Single Port V.A.T.S.

 6.3.1 Tecnica Chirurgica

 6.3.2 Complicanze

Capitolo VII - Esperienza Personale

7.1 Materiale e metodi.....

Conclusioni.....

Bibliografia.....

Prefazione

Il versamento pleurico maligno è una complicanza piuttosto frequente di numerosi tumori sia di origine intratoracica che a partenza da organi extratoracici ed ha un'incidenza di circa 660 pazienti per milione di abitanti l'anno nel mondo.¹

Il carcinoma polmonare da solo è la seconda causa più comune di versamento pleurico maligno in pazienti con età superiore a 50 anni² con una percentuale che va dal 7% al 15%^{3/4} secondo le varie statistiche. Esso infatti costituisce, ad oggi, la prima causa di morte per neoplasia a livello mondiale. Nel 85% dei casi insorge in soggetti fumatori, anche se negli ultimi anni si è riscontrata una percentuale sempre maggiore di tumori polmonari insorti in soggetti che non hanno mai fumato.

Controversi sono i risultati circa la possibilità e l'utilità di campagne di screening, per via dell'ancora insufficiente sensibilità delle tecniche diagnostiche, atte a rivelare stadi precoci della malattia che rendono possibile l'esecuzione di interventi chirurgici curativi, in grado di ridurre sensibilmente la mortalità. Infatti poiché nella maggior parte dei pazienti si giunge alla diagnosi quando la malattia è in stadio avanzato, la sua prognosi generalmente è scarsa, con una sopravvivenza media a 5 anni del 15%.

Tuttavia il miglioramento delle tecnologie adoperate nel campo dell'oncologia molecolare negli ultimi anni e l'evidenza che alcuni pazienti con tumore anche in stadio avanzato rispondano bene a terapie farmacologiche

¹ Lee YC, Light RW: Management of Malignant Pleural Effusion. (Related articles) *Respirology*, 2004 ;9 (2) : 148-56

²Matthay RA, Coppage L, Shaw C, FildermanAE : Malignancies metastatic to the pleura. *Invest Radiol*, 1990; 25:601-619

³Cohen S, Hossain SA. Primary carcinoma of the lung: a review of 417 histologically proved cases. *Dis Chest* 1966;49:67-74.

⁴Johnston WW. The malignant pleural effusion: a review of cytopathologic diagnosis of 584 specimens from 472 consecutive patients. *Cancer* 1985;56:905-909.

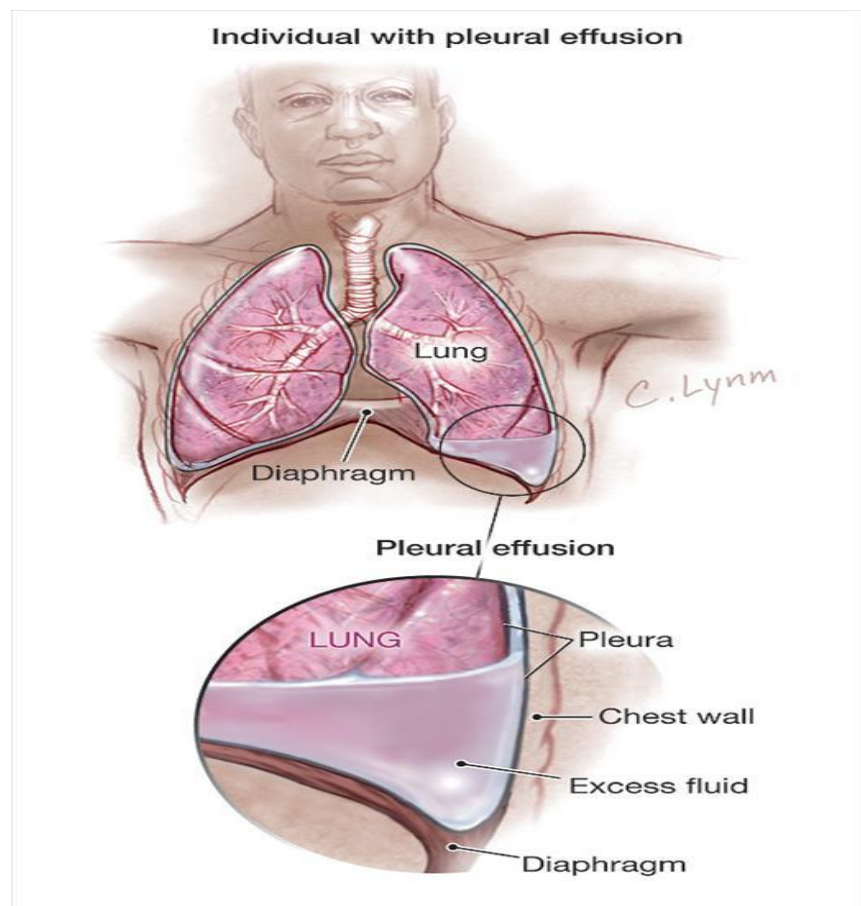
mirate, hanno conquistato l'attenzione di alcuni studi biomolecolari su questo tumore.

Le indagini biomolecolari infatti possono caratterizzare meglio il potenziale maligno della neoplasia fornendo, in associazione con le indagini convenzionali, parametri prognostici e terapeutici più specifici.

Capitolo I

1.1. Definizione

Il versamento pleurico è l'abnorme accumulo di liquido pleurico fra i due foglietti pleurici, conseguente ad un'alterazione dell'equilibrio tra processi di produzione e di riassorbimento del liquido pleurico fisiologicamente presente tra la pleura parietale e quella viscerale. Infatti la cavità pleurica contiene fisiologicamente una piccola quantità di liquido pleurico, approssimativamente 10 ml.⁵



⁵Sahn SA – State of the art – the pleura. *Am Rev Respir Dis.* 1988;138:184-234.

1.2. Epidemiologia

Il versamento pleurico è di riscontro clinico molto comune. Una percentuale molto alta di versamenti pleurici 30-40% è riconducibile a scompenso cardiaco congestizio, il restante 60-70% è secondario a polmoniti (versamento parapneumonico) o neoplasie.⁶

I versamenti pleurici maligni sono piuttosto frequenti, interessano 660 pazienti per milione di abitanti l'anno nel mondo.⁷

I pazienti con tumori noti possono avere un versamento pleurico di tre tipi:

- ✓ non neoplastico
- ✓ paraneoplastico
- ✓ neoplastico.⁸

Infatti, un danno a carico di una qualunque parte della rete di drenaggio linfatico determinato dalla disseminazione per via linfatica o ematogena di cellule neoplasiche può esitare in un versamento pleurico maligno⁹

Il termine versamento pleurico maligno (neoplasico) si riferisce ad un versamento che è il risultato dell'infiltrazione diretta della pleura da parte delle cellule neoplasiche; mentre il termine paraneoplastico descrive un versamento che è il risultato indiretto della presenza di una neoplasia nello spazio pleurico

⁶ BTS Pleural Disease Guideline 2010 – Thorax, 65: ii1-ii76,2010

⁷ Lee YC, Light RW: Management of Malignant Pleural Effusion. (Related articles) *Respirology*, 2004 ;9 (2) : 148-56

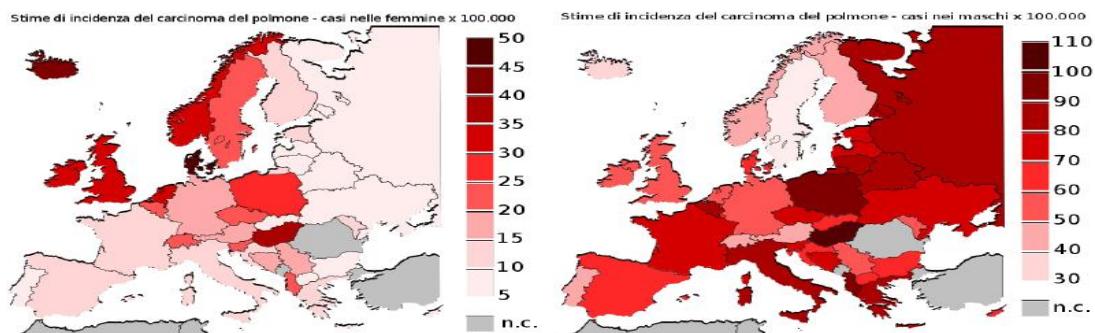
⁸Fenton KN, Richardson JD: Diagnosis and Management of Malignant Pleural Effusion. *Am J Surg*; 1995 ; 170(1):69-74

⁹Miserocchi G, Venturoli D, Negrini D, et al: Intrapleural fluid movements described by a porous flow model. *J applPhysiol*, 1992;73:2511-516

che può determinare ostruzione dei linfonodi mediastinici, ostruzione bronchiale, embolia polmonare, sindrome della vena cava superiore o decremento della pressione oncotica.¹⁰ Infine la variante non neoplasica descrive un versamento pleurico in cui non sono presenti cellule neoplasiche.¹¹

I carcinomi sono la seconda causa più comune di versamento pleurico in pazienti con età superiore a 50 anni. ¹²In pazienti con tumore del polmone primitivo, il VP si riscontra dal 7% al15%^{13/14}.

Il cancro al polmone è la più comune causa di disseminazione pleurica di micrometastasi e presenta la sopravvivenza più bassa; questo, assieme col cancro della mammella, che è la seconda causa per incidenza, rappresentano circa il 50-65% di tutti i versamenti pleurici neoplasici. I versamenti pleurici riconducibili a mesotelioma, ai carcinomi del tratto genito urinario, gastroenterico e ai linfomi rappresentano circa il 25%. Esiste infine un ultimo gruppo di versamenti pleurici maligni con neoplasia primitiva sconosciuta che si aggira intorno al 7-15%.¹⁵



¹⁰Heffner JE –Diagnosis and management of malignant pleural effusion. *Respirology*. 2008;13:5-20

¹¹Moghissi K- The Malignant pleural effusion:tissue diagnosis and treatment. *International Trends*.In:Deslauriers J, Laquet KL. *General Thoracic Surgery* vol.6.St.Louis, Missouri :C.V.Mosby Company 1990:397-408

¹²Matthay RA, Copping L, Shaw C, FildermanAE : Malignancies metastatic to the pleura. *Invest Radiol*, 1990; 25:601-619

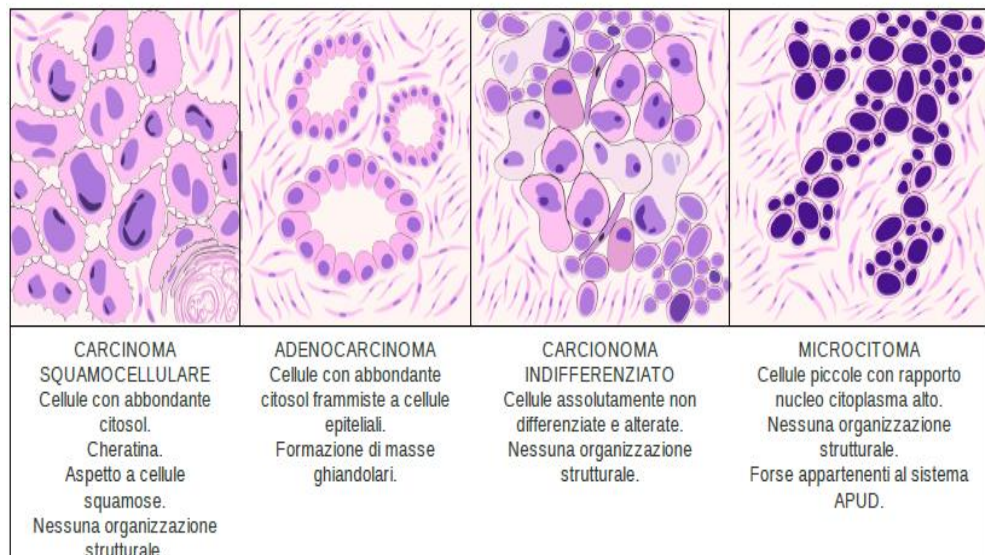
¹³Cohen S, Hossain SA. Primary carcinoma of the lung: a review of 417 histologically proved cases. *Dis Chest* 1966;49:67-74.

¹⁴Johnston WW. The malignant pleural effusion: a review of cytopathologic diagnosis of 584 specimens from 472 consecutive patients. *Cancer* 1985;56:905-909.

¹⁵Abbruzzese JL, Abbruzzese MC, Hess KR, et al : Unknown primary carcinoma: natural history and prognostic factors in 657 consecutive patients. *J Clinic Oncol*, 1994; 12:1272-280

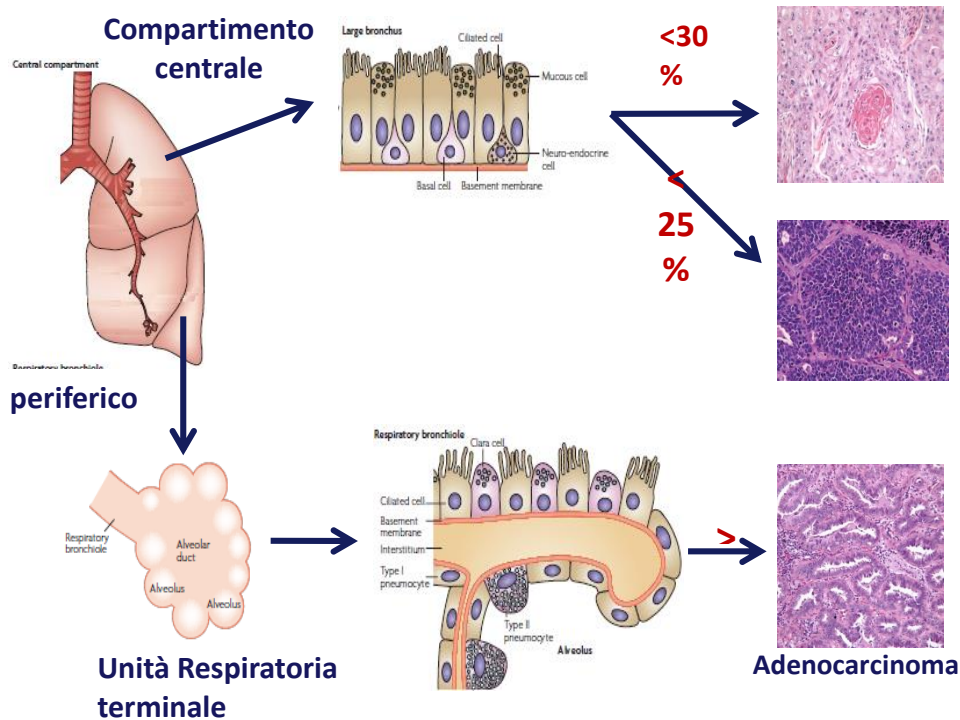
In ordine di frequenza, i quattro istotipi di tumore polmonare più frequenti sono:

- L'adenocarcinoma con una percentuale superiore al 30%;
- Il carcinoma squamocellulare (o squamoso) con una percentuale intorno al 30%;
- Il microcitoma con una percentuale intorno al 25%;
- Il carcinoma a grandi cellule con una percentuale di circa il 10-15%.



Un tempo, fino alla fine degli anni Sessanta, il carcinoma squamocellulare era l'istotipo predominante; negli ultimi 30 anni invece si è registrata una riduzione dell'incidenza di tale istotipo e parallelamente un incremento dell'adenocarcinoma.¹⁶

¹⁶ De Vita



I VPM si sviluppano in pazienti con neoplasia disseminata, in fase avanzata, segnalando una ridotta aspettativa di vita, con una sopravvivenza media dopo la diagnosi che varia da 3 a 6 mesi.¹⁷ Sino a qualche anno fa la presenza del VPM associato ad una neoplasia polmonare veniva classificata come T4 (stadio IIIB), in una recente analisi del database della IASLC¹⁸ è stata riportata una sopravvivenza media di 488 pazienti con VP maligno comparata con altri cT4M0 di 8 mesi vs 13 mesi; il tasso di sopravvivenza a 5 anni è risultato del 2% per i pazienti con VP maligno vs il 15% delle altre categorie cT4M0. Sulla scorta di tali evidenze, la classificazione del VP maligno è stata riclassificata dalla categoria T4 alla nuova categoria M1a.

¹⁷Chernow B, Sahn SA: Carcinomatous involvement of the pleura : an analysis of 96 patient. Am J Med, 1977; 63:695-702

¹⁸Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The new lung cancer staging system. Chest 2009;136:260- 271.

Capitolo II

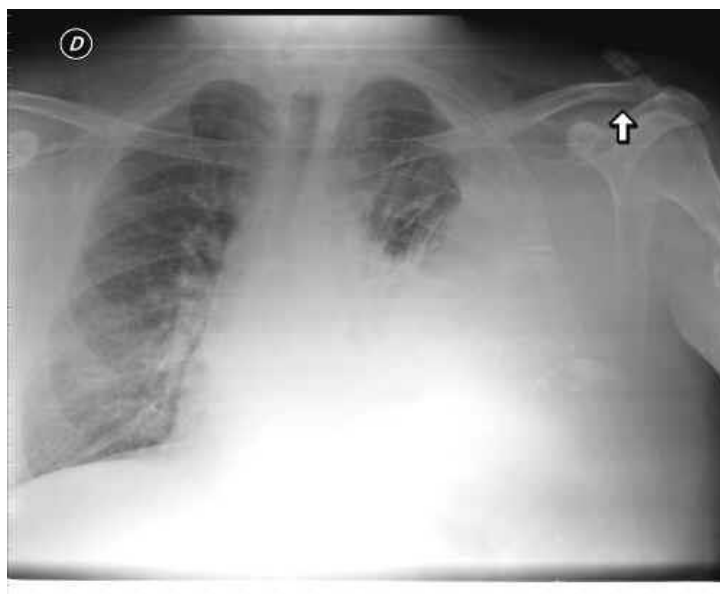
2.1. Diagnosi

La presenza di un versamento pleurico può essere facilmente riconosciuta dalla sintomatologia del paziente (dolore, dispnea, tosse) e dall'esame obiettivo del torace.

Affinché un versamento sia apprezzabile occorre che raggiunga una quantità di 300-500 cc.

L' RX TORACE in due proiezioni è il primo esame da eseguire per la conferma della presenza e dell'entità del versamento pleurico nonché per la valutazione generale delle strutture toraco-polmonari. Il reperto che può presentarsi alla nostra osservazione è:

- Un emitorace opacizzato (soprattutto se il versamento pleurico è massivo);
- Dislocazione delle strutture mediastiniche controlaterale all'opacità
- Innalzamento della cupola diaframmatica (se visibile) dal lato opacizzato
- L'obliterazione del seno costo-frenico (anche se non è patognomnico);
- Linea di Damoiseau-Ellis.



Nei casi dubbi, come quando al versamento pleurico si sovrappongono altre opacità e atelectasie o nei casi di versamento di scarsa entità (100-200 ml), l' ECOGRAFIA AL TORACE può essere utile per confermare la presenza di versamento, stimare la quantità, fissare i punti di repere per l' esecuzione della toracentesi riducendo il rischio di PNX.

La TC TORACE con mezzo di contrasto (mdc) è spesso eseguita, soprattutto nei casi sospetti per neoplasia e può fornire indicazioni, oltre che sulla presenza di versamento, anche sulla sua disposizione spaziale: ciò è utile soprattutto nel caso di versamenti saccati (la linea di Damoiseau-Ellis sarà posizionata in sede dorso ventrale perchè il paziente e' disteso).

Accertata la presenza di un versamento pleurico, si procede con l' esecuzione di un prelievo di campione pleurico per gli esami fisico/chimici, citologici, batteriologici.

Capitolo III

3.1. Caratteristiche del Liquido Pleurico

La prima cosa da valutare appena prelevato il liquido pleurico è il suo aspetto. Per quanto non sia possibile fare diagnosi di natura solamente in base al colore, l'aspetto può comunque orientarci sulla diagnosi.

- ✓ -Colore normale: 70% dei casi giallo citrino



- ✓ Emorragico: se $Ht > 50\%$ si parla di emotorace. Può essere riconducibile a traumi toracici, versamenti neoplasici; talvolta infarto polmonare
- ✓ Siero-Emorragico: (ambrato o color mattone) è di verosimile natura neoplasica o infiammatoria. La presenza di un'infezione batterica o di una pleurite tubercolare è palesata dalla presenza di un alto numero di globuli bianchi, con elevata percentuale di neutrofili. Tuttavia una linfocitosi in più del 50% dei casi può essere ricollegata alla presenza di una neoplasia maligna;
- ✓ Empiematoso: presenza di pus

- ✓ Chiliforme con presenza di chilomicroni è riconducibile a chilotorace per rottura dotto toracico. Allora è importante come prima indagine dosare i trigliceridi, che saranno >110 mg/dl, ma anche il colesterolo. In questo caso, qualora vi fosse una prevalenza di colesterolo con valori >250mg7dl, allora parleremo di pseudochilotorace. Altre cause minori possono essere linfomi, traumi, interventi chirurgici, linfoangiomiomatosi;
- ✓ Verdastro: pancreatite per cui è importante dosare le amilasi sul liquido pleurico
- ✓ Nero (ormai raro): infezione da aspergillo
- ✓ Marrone(raro): rottura di ascesso amebico

Esame fisico/chimico: dosaggio del contenuto proteico, livelli di LDH, Ph, glucosio, citologia.

Al fine di distinguere tra' essudato e trasudato sono universalmente utilizzati i **CRITERI DI LIGHT**¹⁹

Possiamo parlare di essudato:

- ✓ Se il rapporto proteinetotali LP/proteine plasmatiche >0,5
- ✓ Se le proteine LP>3
- ✓ Se LDH LP/LDH plasma >0,6e/o LDH LP>200UI

¹⁹BST Pleural Disease Guideline 2010 – Thorax,65: ii1-ii76,2010

Tali criteri devono essere però valutati anche in base alla storia clinica del paziente. Infatti, per esempio, un paziente che assume diuretici come terapia per lo scompenso cardiaco congestizio avrà un aumento dei livelli di proteine e LDH nel liquido pleurico e secondo i criteri di Light dovrebbe essere definito un essudato. In realtà è un pseudo-essudato perchè in effetti se andiamo a valutare altri parametri quali la differenza di concentrazioni di albumina nel liquido pleurico e nel siero, per valori $>1,2$ g/dl il versamento è con ogni probabilità un trasudato.

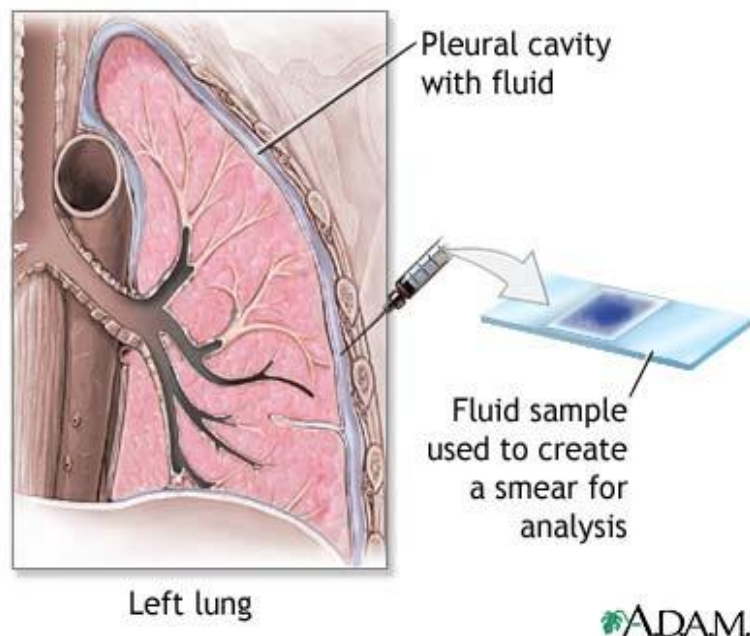
In caso di neoplasia metastatizzata al cavo pleurico, più bassa è la concentrazione di glucosio peggiore è la prognosi.

La diagnosi di un versamento pleurico maligno richiede la dimostrazione citologica della presenza di cellule tumorali nel tessuto o nel liquido pleurico oppure una diagnosi istologica. L'esame citologico del liquido rappresenta un metodo rapido e mini-invasivo per ottenere una diagnosi di natura. La sensibilità di tale indagine varia dal 40% all'87%, con una media del 60%. In particolare, è possibile porre diagnosi sul primo campione nel 65% dei casi, in un ulteriore 27% sul secondo campione e solo nel 5% sul terzo campione²⁰. È opinione comune che una corretta diagnosi citologica dipenda dall'esperienza e dall'attenzione del citologo e dal tipo di tumore (migliore per l'adenocarcinoma rispetto al mesotelioma, al carcinoma squamoso, al linfoma e al sarcoma)²¹. A tale scopo, dimostrata la presenza di un versamento pleurico all'esame obiettivo e dalla radiografia del torace, dovrebbe essere eseguita una

²⁰ Tan C, Sedrakyan A, Browne J, Swift S, Treasure T. The evidence on the effectiveness of management for malignant pleural effusion: a systematic review. *Eur J CardiothorSurg* 2006;29:829-838.

²¹ Anthony V, Loodenkemper R, Astoul P, Boutin C, GoldstrawP, Hott J. Management of malignant pleural effusions. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000;162(5):1987-2001.

toracentesi diagnostica²². La combinazione della citologia e della biopsia pleurica porta alla diagnosi definitiva nel 73-93%²³.



SENSIBILITA' DIAGNOSTICA DELLA CITOLOGIA

Versamento Pleurico	Sensibilità diagnostica della citologia
Adenocarcinoma al polmone	70%
Mammella	40%
Linfoma di H	25-30%
Linfoma non H	0-80%
Sarcoma	25%

²²GiacomoCusumano, Stefano Margaritora, VenanzioPorziella et al: Ann. Ital. Chir.,2007; 78: 389-391

²³ BTS guidelines for the investigation of a unilateral pleuraleffusion in adults Thorax, 2003; 58 (Suppl II):ii8-ii17

Carcinoma epidermoide	20%
Mesotelioma	10%

Light RW. Pleural Effusion. NEJM 2002;346:1971-1977

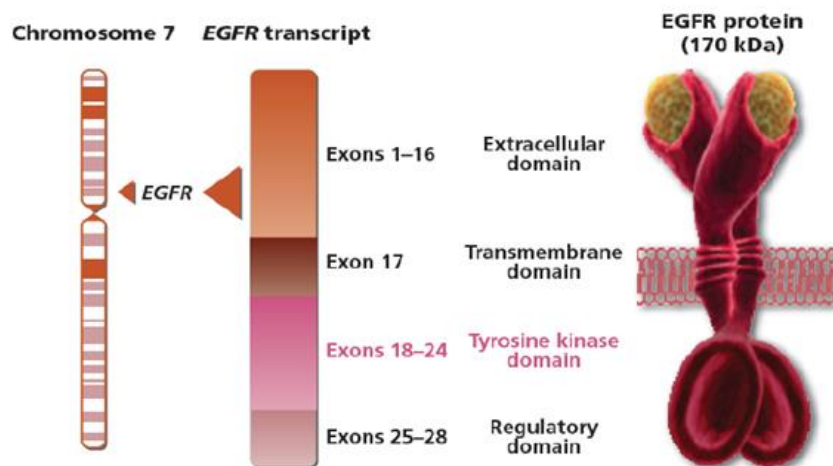
Capitolo IV

4.1. Genesi molecolare

Molti pazienti vengono già all'osservazione con una patologia in fase avanzata. In tali casi il trattamento chirurgico non è più proponibile e la terapia di scelta è di tipo sistemico con la chemioterapia. Generalmente viene utilizzato un regime terapeutico con due tipi di farmaci in combinazione che spesso include un agente del platino. Tuttavia la sopravvivenza media dei pazienti con tumore non a piccole cellule (NSCLC) in fase avanzata rimane non superiore a 8-10 mesi.²⁴

Nel ricercare nuove strategie terapeutiche, potenziali e interessanti vantaggi sembrano offrirci gli studi in ambito biomolecolare soprattutto per quanto concerne la presenza del gene per l'epidermal growth factor receptor (EGFR) presente a livello del cromosoma 7 in pazienti affetti da NSCLC.

²⁴Breathnach OS, Freidlin B, Conley B, Green MR, Johnson DH, Gandara DR, O'Connell M, Shepherd FA, Johnson BE. Twenty-two years of phase III trials for patients with advanced non-small-cell lung cancer: sobering result. *J Clin Oncol*. 2001;19:1734-1742; Kelly K, Crowley J, Bunn PA, Jr, Presant CA, Grevstad PK, Moinpour CM, Ramsey SD, Wozniak AJ, Weiss GR, Moore DF, Israel VK, Livingston RB, Gandara DR. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial. *J Clin Oncol*. 2001;19:3210-3218; Schiller et al, 2002 Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, Zhu J, Johnson DH., the Eastern Cooperative Oncology Group Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2002;346:92-98.



È stato dimostrato che il gene *EGFR* è massimamente espresso nei pazienti con NSCLC²⁵; approssimativamente il 10-20% degli adenocarcinomi è positivo all'analisi mutazionale per *EGFR*²⁶ e si è visto come questi pazienti mostrassero una forte responsività alla terapia con TKI (**Gefitinib e Erlotinib**)²⁷.

Dai test condotti nel 2004 si sono identificate le specifiche regioni del gene *EGFR* coinvolti nella maggiore sensibilità ai farmaci biologici appartenenti alla famiglia dei TKI.

²⁵Franklin WA, Veve R, Hirsch FR, Helfrich BA, Bunn PA., Jr Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *SeminOncol.* 2002;29:3-14

²⁶Pan Q, Pao W and Ladanyi M: Rapid polymerase chain reaction based detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in lung adenocarcinomas. *J MolDiagn* 7:396-403,2005

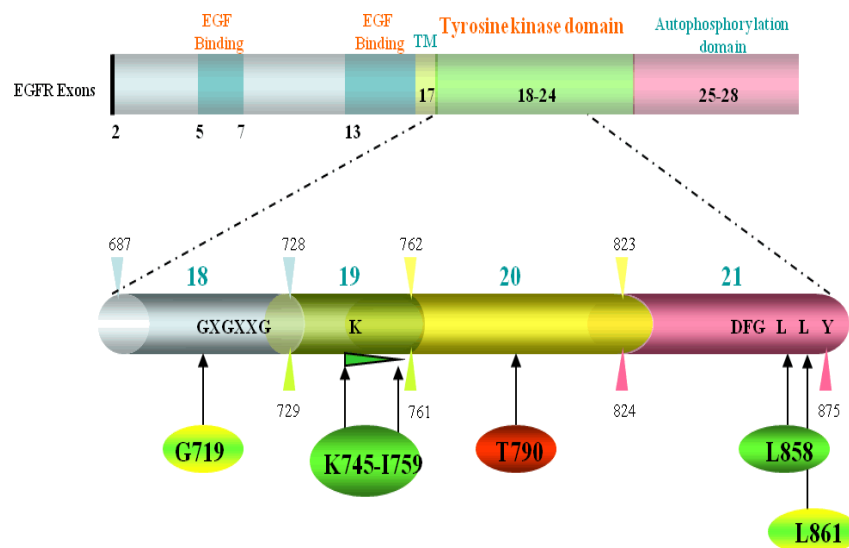
²⁷Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004;350:2129-2139;

Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. *EGFR* mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.*2004;304:1497-1500. ;

Han SW, Kim TY, Hwang PG, Jeong S, Kim J, Choi IS, Oh DY, Kim JH, Kim DW, Chung DH, Im SA, Kim YT, Lee JS, Heo DS, Bang YJ, Kim NK. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J ClinOncol.* 2005;23:2493-2501

La mutazione a carico di EGFR si trova soltanto allo stato di eterozigosi e coinvolge la regione tirosin-chinasica che codifica per il sito di legame per l'ATP²⁸ determinando una attivazione indipendente di EGFR e contemporaneamente aumentando la sensibilita' agli inibitori della tirosinchinasi²⁹. Gli esoni maggiormente coinvolti sono 18, 19, 20 e 21.

Lo schema delle mutazioni del gene EGFR è rappresentato in Figura 1.



Circa il 90% delle mutazioni si trova a carico degli esoni 19 e 21: quella a carico dell'esone 19 è una mutazione frameshift con delezione di 9-24 nucleotidi localizzati intorno ai codoni 746-750 e rappresenta il 50% delle mutazioni presenti; quella a carico dell'esone 21 viene riscontrata nel 45% dei casi e si tratta di una mutazione puntiforme localizzata al nucleotide 2573 (dove la sequenza CTG viene mutata a CGG) ed è il risultato di una sostituzione di una leucina con una arginina al codone 858 (L858R).³⁰ Queste mutazioni (delezioni dell'esone 19 ed L858R), generalmente riscontrate con maggiore

²⁸Sordella R, Bell DW, Haber DA and Settleman J: Gefitinib sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathway. Science 305: 1163-1167, 2004

²⁹ Lynch et al 2004

³⁰Dahse R., Berndt A., Kosmehl Hartwig: PCR-based Testing for therapy-related EGFR Mutations in patients with Non-Small Cell Lung Cancer. HELIOS Clinic Erfurt, institute of Pathology, Erfurt; Friedrich Schiller University Jena, Institute of Pathology, Jena, Germany

frequenza in soggetti di sesso femminile e nei soggetti non fumatori, danno una buona risposta al trattamento con inibitori della tirosinchinasi³¹.

Si è visto invece che le mutazioni a carico dell'esone 20 (inserzioni e T790M), che rappresentano circa il 10% di tutte le mutazioni a carico di questo gene, conferiscono invece una scarsa responsività al trattamento con Gefitinib (inserzioni) o resistenza (T790M). Tuttavia si è anche visto che esisteva una certa differenza individuale legata a differenti tipi di mutazioni a carico dell'esone 20 come (D 770_N771insNPG) o quella D761Y a carico dell'esone 19, oppure ancora legata alla coesistenza di più mutazioni. Infatti, testando 23 pazienti positivi per la mutazione a carico dell'esone 20 dell'EGFR, gli studiosi del Department of Internal Medicine, National Taiwan University Hospital, hanno registrato una risposta al Gefitinib pari al 25%; percentuale che aumentava se vi era la coesistenza di più mutazioni sino a raggiungere il 44 %. Sebbene la responsività rimanga di gran lunga inferiore rispetto a quella registrata nei pazienti con delezioni nell'esone 19 e L858R, senza dubbio offre un ottimo punto di partenza per studi futuri.³²

Infine esiste un gruppo di mutazioni ancora non ben conosciute clinicamente perchè poco frequenti che si riscontrano nell'esone 18 (G719 ed S768) e 21 (L861Q). In genere queste mutazioni danno una risposta variabile al trattamento con inibitori delle TKI.

³¹ Lynch et al 2004

³²Jenn-Yu Wu1, Shang-Gin Wu1, Chih-Hsin Yang2, Chien-Hung Gow4, Yih-Leong Chang3, Chong-Jen Yu1, Jin-Yuan Shih1 and Pan-Chyr Yang1

4.2. Incidenza delle mutazioni

Gli studi condotti dal Dipartimento di Patologia, St. Antonius Hospital, Nieuwegein, Paesi Bassi, hanno mostrato una frequenza significativamente maggiore di mutazioni per EGFR in pazienti con adenocarcinoma al polmone con versamento pleurico maligno/pericardico (26.5%; odds ratio (OR) 2.80, 95% confidence interval (CI) 1.22-6.41). Infatti su 778 pazienti esaminati solo 71 (9,1%) presentavano mutazioni per EGFR e di questi 66 presentavano un adenocarcinoma al polmone in stadio avanzato con versamento pleurico.

Nella coorte sono stati presi in esame pazienti rientranti nella popolazione dell'Europa Occidentale e si è visto che la frequenza complessiva di mutazioni per EGFR in adenocarcinomi polmonari rientra nella gamma di frequenza del Nord America e delle popolazioni degli stati del Sud Europa³³, ma comunque inferiore rispetto alle percentuali riscontrate in pazienti di razza asiatica (Giapponesi soprattutto): basti pensare che su un'alta percentuale di adenocarcinomi al polmone (92,3%) presentavano la mutazione per il gene dell' EGFR solo il 28,2% dei pazienti testati³⁴.

4.3. Ricerca genica

I pazienti affetti da carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC) mostrano un aumento significativo della sopravvivenza a seguito del trattamento con farmaci monoclonali (gefitinib, erlotinib) che inibiscono l'attività del gene EGFR e ne bloccano l'espressione. Tuttavia, solamente i pazienti che presentano mutazioni a carico del gene EGFR traggono il maggior beneficio dal trattamento, mentre i pazienti con EGFR non mutato (wild-type)

³³AJ Smits , Kummer JA , Hinrichs JW , Herder GJ , Scheidel-Jacobse KC , Jiwa NM , Ruijter TE , Nooijen PT , Looijen-Salamon MG , Ligtenberg MJ , Thunnissen FB , Heideman DA , de Weger RA , A Vink .Dipartimento di Patologia, St. Antonius Hospital, Nieuwegein, PaesiBassi. [Cella Oncol \(Dordr\)](#). 2012 Giu, 35 (3) :189-96. doi: 10.1007/s13402-012-0078-4. Epub 2012 Apr 12.

³⁴Takano et al 2005; Asano et al 2006

hanno benefici ridotti o nulli. Di conseguenza, la precisa determinazione dello status dell'EGFR (ovvero, se mutato o non mutato) è fondamentale per la selezione dei pazienti da avviare al trattamento. Purtroppo però il tessuto tumorale è spesso difficilmente ottenibile o comunque non sufficiente per un'analisi mutazionale per EGFR in pazienti con NSCLC in stadio avanzato.

La decisione della ricerca mutazionale per EGFR deve essere presa dal clinico al momento della diagnosi e dipende anche dalla disponibilità di materiale biologico prelevabile. Concettualmente tutti i pazienti con diagnosi di NSCLC (istotipo adenocarcinoma, carcinoma a grandi cellule, carcinoma misto con adenocarcinoma, e i NAS:NSCLC non altrimenti specificati) possono essere testati per queste mutazioni, ma particolare attenzione viene posta verso soggetti con determinate caratteristiche:

- ✓ sesso femminile,
- ✓ non fumatori,
- ✓ diagnosi di adenocarcinoma,

considerata la maggiore frequenza delle mutazioni in questa sottopopolazione.

4.4. Campini tissutali

Esistono differenti tecniche biottiche che possono essere impiegate per ottenere del materiale istologico di buona qualità; tra queste vi sono: la biopsia transbronchiale, la biopsia endobronchiale, la biopsia mediante guida TAC, la mediastinoscopia, la video-toracosopia chirurgica assistita e la toracotomia. Il numero delle biopsie e delle cellule ottenibili dalle differenti tecniche biottiche è riassunto nella tabella sottostante (Tabella 1)

Tabella 1: Tecniche Biottiche				
	21-g aspirazione con ago sottile	19-g aspirazione con ago sottile	Biopsia trasbronchiale	Biopsia TC guidata con ago sottile
N°di cellule ottenibili attraverso la biopsia	≥ 100	≥ 150	≥ 150	≥ 500
N° di biopsie necessarie	4	4	4-5	2-3

Poichè dunque un'elevata percentuale di pazienti non può essere sottoposta al prelievo di un campione tissutale; negli ultimi anni si è cercato di capire se l'analisi mutazionale per EGFR attraverso tecniche come l'estrazione del DNA e la reazione polimerasica a catena (PCR, polymerasechainreaction) potessero essere applicate su campioni citologici.

Campioni biologici possono essere ottenuti mediante ago-aspirazione, lavaggio bronco-alveolare o “scraping” bronchiale. Negli ultimi anni si è anche preso in considerazione l'utilizzo di cellule neoplasiche presenti nei versamenti pleurici secondari ad NCSCL come fonte per l'analisi mutazionale dell'EGFR.

Sicuramente uno dei punti di partenza risiede nel fatto che, come si evince da diversi studi³⁵, pazienti con versamento pleurico maligno secondario ad adenocarcinoma polmonare mostrano delle percentuali di mutazione per EGFR (delezione EX19 e mutazione puntiforme EX21) di gran lunga superiori rispetto agli altri istotipi polmonari e ad altri pazienti a cui è stato possibile asportare i campioni chirurgicamente; e questo come più volte detto risulta

³⁵ Wu SG , Gow CH , Yu CJ , Chang YL , Yang CH , Hsu YC , Shih JY , Lee YC , PC Yang .Dipartimento di Medicina Interna, National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan. [EurRespir J](#) 2008, 32 (4) :924-30. doi: 10.1183/09031936.00167407. Epub 2008 28.

essere predittivo positivo nella risposta al trattamento con l'inibitore dell'attività tirosinchinasica(TKI)³⁶.

In circa la metà dei pazienti con NSCLC che presentano un versamento pleurico (IIIB, IV), questo è citologicamente positivo al primo esame e di questi molti sono di tipo neoplasico. Prelevare del liquido pleurico è di solito semplice, non invasivo e ripetibile per cui è stato ipotizzato che potesse essere utilizzato come metodica diagnostica nella ricerca delle mutazioni del gene dell'EGFR e di conseguenza per valutare dati predittivi positivi di risposta al Gefitinib³⁷

Dagli studi condotti dal National Cancer Center Hospital di Tokyo, comparando i risultati sull'analisi del DNA di campioni prelevati con metodiche diverse:

- ✓ FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded tissue
- ✓ BB: brushing con broncofibroscopio
- ✓ PE: citologico da versamento pleurico

Si è visto che le percentuali di successo con le varie metodiche erano:

- ✓ 91,4%-100% per FFPE
- ✓ 100% per BB e PE

³⁶ Ann Oncology, 20012 jul9 An evaluation study of EGFR mutation tests utilized for non small cell lung cancer in the diagnostic setting

³⁷Hideharu Kimura,1,2 Yutaka Fujiwara,3 Takashi Sone,2 Hideo Kunitoh,3 Tomohide Tamura,3 Kazuo Kasahara2 and Kazuto Nishio1,4,5,6

EGFR mutation status in tumor-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting the response to Gefitinib 2006 Nov 14

Per cui la ricerca mutazionale per EGFR su campioni di DNA prelevato dal liquido pleurico è assolutamente una valida alternativa alle altre metodiche³⁸.

4.5. Analisi dei campioni

Il materiale prelevato può essere strisciato e colorato su un vetrino oppure può essere preparato un citoincluso. Nel caso di materiale strisciato, è necessaria la rimozione del coprioggetto in xilolo per circa 72 ore, seguita da lavaggi delle cellule in etanolo. Le aree del vetrino contenenti un maggior numero di cellule tumorali vengono demarcate e rimosse con la punta di un bisturi o un ago e riposte nel tubo EPPENDORF.

Il citoincluso consiste nell'inclusione in blocchi di paraffina del materiale prelevato su cui poi verranno effettuate un congruo numero di sezioni da 10 micron, manualmente o con laser, che verranno raccolte in un tubo EPPENDORF. Le sezioni vengono lavate in alcool e disidratate prima di proseguire con le procedure di analisi.

Varie tecniche possono essere utilizzate per l'analisi delle mutazioni del gene EGFR, queste possono essere distinte in metodiche di screening che possono evidenziare tutte le mutazioni, incluse nuove mutazioni; e metodiche a bersaglio mutazionale che permettono la diagnosi di specifiche mutazioni già note.

³⁸Hideharu Kimura,^{1,2} Yutaka Fujiwara,³ Takashi Sone,² Hideo Kunitoh,³ Tomohide Tamura,³ Kazuo Kasahara² and Kazuto Nishio^{1,4,5,6} EGFR mutation status in tumor-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting the response to Gefitinib 2006 Nov 14
¹Shien-Laboratory, National Cancer Center Hospital, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, ²Respiratory Medicine, Kanazawa University Hospital, 13-1 Takara-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-8641, ³Medical Oncology, National Cancer Center Hospital, Tsukiji 5-1-1, Chuo-ku, Tokyo 104-0045 and ⁴Pharmacology Division and ⁵Center for Medical Genomics, National Cancer Center Research Institute, Tsukiji 5-1-1, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan. Cancer Sci | July 2006 | vol. 97 | no. 7 | 642-648 doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00216.x
© 2006 Japanese Cancer Association

Tra le metodiche di screening ricordiamo in ordine:

- ✓ Il sequenziamento diretto del prodotto della PCR secondo SANGER;
- ✓ Il pirosequenziamento
- ✓ Metodiche basate sulla denaturazione “melting” del DNA, come HRMA (high resolution melting analysis)
- ✓ L’analisi SSCP (single strand conformation polymorphism)

Le prime due permettono di effettuare diagnosi del tipo specifico di mutazione; mentre HRMA e l’SSCP forniscono informazioni sulla presenza o assenza di una mutazione per cui possono risultare utili per selezionare i casi da sequenziare.

Tra le metodiche a bersaglio molecolare le più diffuse risultano essere quelle basate sull’impiego della Real Time PCR. In genere queste metodiche sono più rapide e sensibili del sequenziamento diretto; esistono dei kit in commercio che riescono ad individuare mutazioni quando le copie di DNA mutato rappresentano circa 1% del DNA totale. Presentano tuttavia, lo svantaggio di evidenziare solo le mutazioni previste a priori. Inoltre i costi per i reagenti sono di solito superiori a quelli utilizzati per le metodiche di screening.

Capitolo V: Tecniche di sequenziamento

5.1. PCR o reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction).

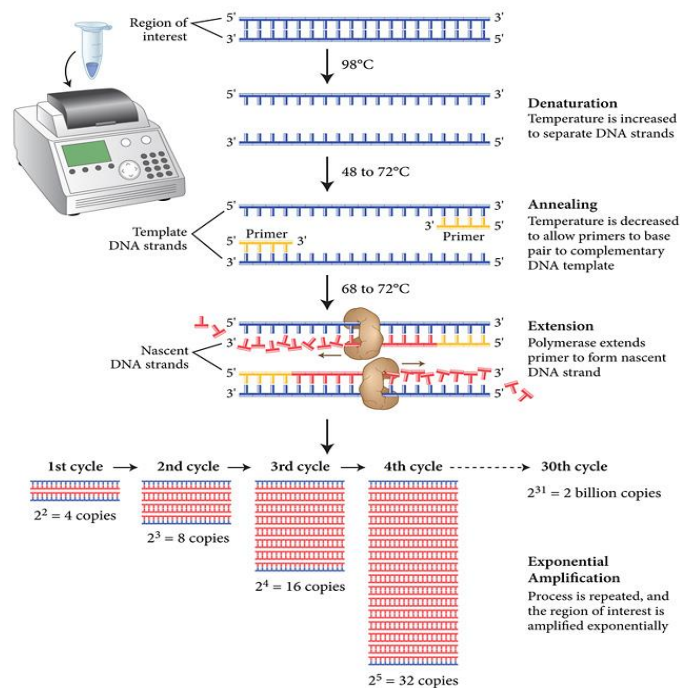
La PCR è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere in vitro molto rapidamente la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni. La PCR ricostruisce in vitro specifiche sequenze di DNA. La reazione di sintesi (duplicazione) di un segmento di DNA "completo" (a doppia elica) a partire da un filamento a singola elica. Il filamento mancante viene ricostruito a partire da una serie di nucleotidi che vengono disposti nella corretta sequenza, complementare a quella del DNA interessato. Questo processo viene svolto in natura da enzimi chiamati DNA-polimerasi, che sono in grado di sintetizzare progressivamente un nuovo filamento di DNA. Si è visto che una quantità di DNA genomico di 100 ng è sufficiente per identificare un gene bersaglio che è presente in una singola copia. La presenza di un basso quantitativo di bersaglio, comunque, aumenta la probabilità che vengano amplificate sequenze non specifiche. Una quantità troppo elevata di DNA, al contrario, può diminuire l'efficienza dell'amplificazione a causa della presenza di troppi elementi contaminanti.

Per queste metodiche di indagine molecolare è infatti necessaria la presenza di almeno il 25%³⁹-80%, preferibilmente il 30-50%, di cellule tumorali, ovvero di almeno il 30% di DNA mutato sul totale del DNA presente

³⁹(Smouse et al.),

nel campione.⁴⁰ Il prodotto della PCR può essere utilizzato per il sequenziamento diretto del tratto amplificato oppure possono essere impiegate altre metodiche per l'identificazione delle mutazioni geniche, come la Real-Time PCR. La PCR è costituita da una serie di cicli tutti uguali e ciascun ciclo è costituito da tre passaggi:

- ✓ Denaturazione dello stampo
- ✓ Ibridazione dei primers
- ✓ Polimerizzazione



La durata ovviamente dipende dalle dimensioni del frammento. In generale il frammento viene denaturato alla temperatura di 95°. La temperatura di “annealing” ossia di ibridazione con il primer è compresa tra 45°-65° in relazione al tipo di primer presente. In fine la fase di polimerizzazione avviene

Bosari S, Marchetti A, Buttitta F, Graziani D, Borsani G, Loda M, Bevilacqua G, Coggi G. Detection of p53 mutations by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) gel electrophoresis. A comparative study of radioactive and nonradioactive silver-stained SSCP analysis. *Diagn Mol Pathol.* 1995;4:249–255⁴⁰;
Fanet al 2001

a 72° temperatura ideale per il funzionamento della Taq Polimerasi (*Thermus aquaticus* Polimerasi). La Taq polimerasi è una DNA polimerasi termostabile in grado di sintetizzare un nuovo filamento di DNA complementare ad uno stampo a singolo filamento come le altre DNA polimerasi ma a temperature più elevate quali quelle presenti negli step di denaturazione, permettendo così l'automatizzazione dell'intera procedura e anche una migliore specificità. L'enzima richiede uno stampo e la presenza di dNTPs.

Ad ognuno dei filamenti dello stampo deve trovarsi appaiato un primer che funga da innesco fornendo un 3'-OH libero; infatti è a partire dal 3'-OH che la DNA polimerasi inizia la sintesi dei nuovi filamenti unendo tra loro i dNTPs complementari allo stampo. I primers sono sequenze di DNA a singolo filamento lunghe da 15 a 30 basi (oligonucleotidi) che si devono appaiare con i due filamenti opposti del DNA stampo in modo tale che le loro estremità 3' si fronteggino: le sequenze dei due oligonucleotidi costituiranno le estremità del frammento amplificato. Si parla di amplificazione del DNA perchè la reazione di duplicazione dei due filamenti dello stampo viene ripetuta per un numero di volte(cicli) prestabilito per cui ad ogni ciclo teoricamente la quantità di DNA presente è raddoppiata.

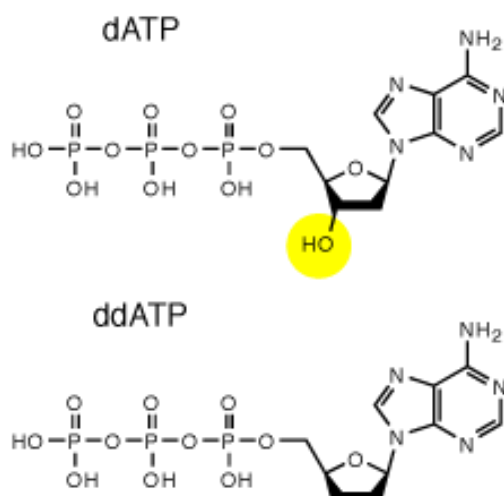
L'amplificazione esponenziale delle sequenze bersaglio e la selettività dovuta alla scelta dei primers conferiscono alla PCR un'altissima sensibilità, tuttavia questo non sempre offre vantaggi in quanto si può incorrere in falsi positivi legato ad un erroneo appaiamento dei primers soprattutto in presenza di contaminazioni dei campioni, anche lievi. A tal proposito l'AIOM suggerisce nella pratica delle reazioni di sequenziamento-pcr allestimento dei campioni sotto cappa a flusso laminare, in ambiente diverso da quello utilizzato per

l'analisi dei prodotti di amplificazione, impiegando materiali dedicati e con le opportune precauzioni onde evitare contaminazione (guanti, puntali di filtro).

I prodotti di due diverse PCR devono essere sequenziati in forward e reverse, in modo da ottenere un numero di 3-4 sequenze per campione. Il controllo quantitativo/qualitativo del prodotto della reazione viene effettuato mediante elettroforesi in gel di agarosio e colorazione con etidio bromuro o con altro intercalante, che consente di valutare l'efficacia della PCR e la specificità del risultato.

5.2. Sequenziamento automatico diretto

Il sequenziamento è la tecnica che consente di conoscere con precisione la successione dei nucleotidi in una molecola di DNA. Questa metodica è basata su una particolare reazione a catena della polimerasi detta reazione di sequenza. Si tratta di una PCR asimmetrica nella quale si utilizza un solo primer per amplificare uno dei due filamenti del DNA stampo. La reazione avviene in presenza di una miscela di desossinucleotidi (dNTP) e di di-desossinucleotidi (ddNTP), marcati con un fluorocromo e presenti in concentrazione inferiore rispetto ai primi.



Una particolare DNA polimerasi sintetizza il filamento riconoscendo entrambi i tipi di nucleotidi. Durante la sintesi del DNA si forma un legame fosfodiesterico tra il gruppo 3' OH dell'ultimo nucleotide incorporato e il gruppo 5' PO₄ del nucleotide in entrata. Ogni nuovo nucleotide legato fornisce il gruppo 3'OH per il legame della reazione successiva. Quando questo legame si forma con un di-desossinucleotide, privo del gruppo chimico OH, il nucleotide successivo non potrà essere aggiunto al filamento nascente e la reazione di sintesi del DNA si arresta. Il risultato di questa reazione è una miscela di frammenti di diversa lunghezza con un ddNTP 3'-terminale che hanno un'estremità 5' comune e un'estremità 3' variabile; la lunghezza del frammento dipende dal momento in cui viene inserito il ddNTP che blocca la reazione di sintesi. Poiché l'inserimento del ddNTP è del tutto casuale, la reazione si può interrompere in corrispondenza di qualunque nucleotide della regione amplificata; nell'insieme di frammenti, dal più piccolo al più grande, ci sarà un ddNTP 3' terminale per ogni nucleotide della regione da sequenziare. I quattro diversi ddNTP saranno marcati con quattro differenti fluorocromi. I frammenti sono separati con l'elettroforesi capillare nel sequenziatore automatico. Durante la migrazione elettroforetica, quando i frammenti raggiungono una cella di rilevazione il relativo ddNTP attraversa la cella, viene colpito da un laser con $\lambda = 488 \text{ nm}$ ed emette fluorescenza.

L'elettroferogramma è la successione dei picchi di fluorescenza registrati durante la migrazione elettroforetica. Ogni picco di fluorescenza identifica una base e la loro lettura in successione permette di conoscere la sequenza del DNA analizzato (fig.)

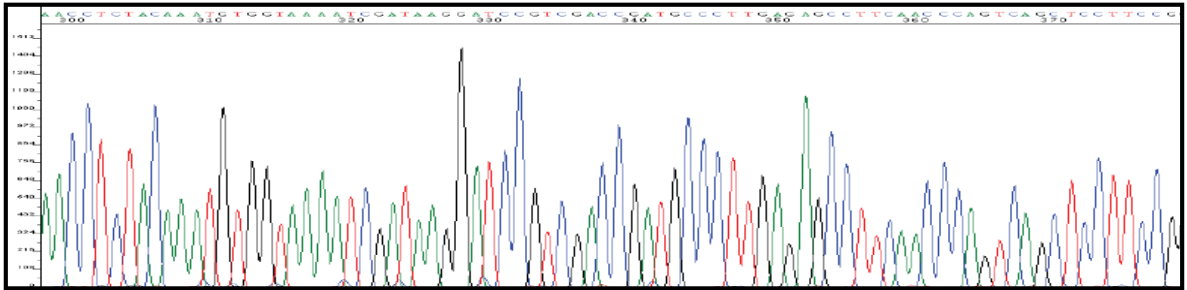


Figura. Elettroferogramma.

Il confronto tra la sequenza rappresentata nell'elettroferogramma e le sequenze registrate nelle banche dati permette di individuare la presenza di eventuali mutazioni del DNA sequenziato. Un campione di DNA eterozigote per una mutazione puntiforme genera un elettroferogramma con un doppio picco in corrispondenza della base mutata; una delezione in eterozigosi genera una serie di doppi picchi dalla delezione in poi.

Lo strumento utilizzato per sequenziare il DNA è un sequenziatore automatico (fig.). I campioni di DNA, caricati in una piastra da 96 pozzetti, sono analizzati dal sequenziatore che rileva in successione i fluorocromi all'estremità 3' dei frammenti prodotti nella reazione di sequenza. La tecnica su cui si basa il suo funzionamento è l'elettroforesi capillare, nella quale la differenza di potenziale tra un elettrodo positivo (anodo) e un elettrodo negativo (catodo) genera una forza elettrica che attrae il DNA, carico negativamente, al polo positivo. Durante la corsa elettroforetica, la velocità di migrazione sarà maggiore per i frammenti più corti e minore per i frammenti più lunghi. I componenti del sequenziatore costituiscono il sistema per l'elettroforesi capillare (fig.).

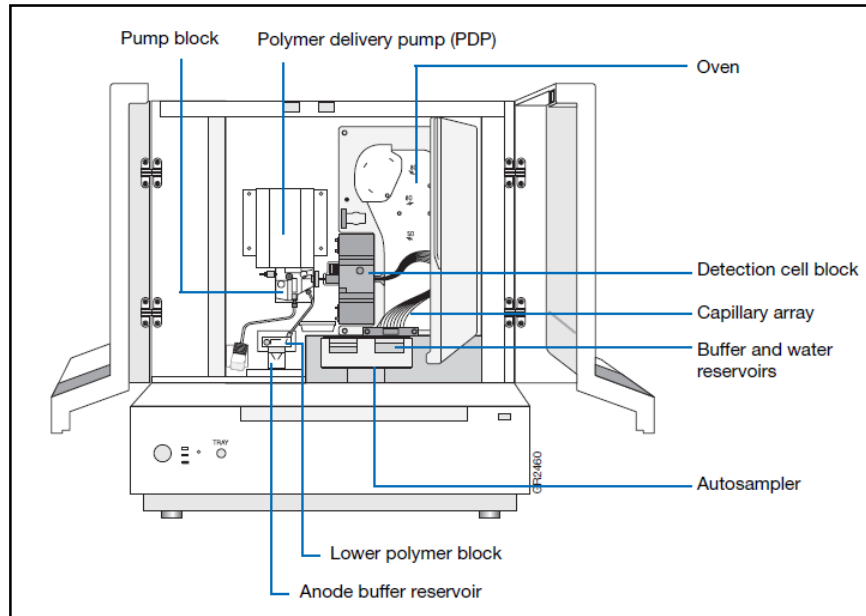


Figura 3130xl GeneticAnalyzer.

La migrazione dei frammenti di DNA avviene all'interno di capillari in silice, disposti in una griglia chiamata capillary array. Un'estremità dei capillari aspira i campioni di DNA dalla piastra; l'altra estremità è collegata alla cella di rilevamento della fluorescenza. I capillari del sequenziatore sono distanziati in modo tale da inserirsi contemporaneamente in 16 pozzetti della piastra. La migrazione elettroforetica necessita di un'opportuna soluzione, il running buffer, contenuto in una vaschetta all'interno del sequenziatore; l'acqua, necessaria per la pulizia dei capillari, è contenuta in tre diverse vaschette. Queste quattro vaschette sono chiuse con un coperchio in gomma, forato secondo lo stesso schema del capillary array per permettere l'ingresso dei capillari nelle vaschette. La piastra con i campioni da analizzare e le quattro vaschette sono collocate su una struttura mobile, chiamata autosampler, un sistema automatizzato che durante l'elettroforesi ciclicamente sposta la piastra e le vaschette sotto i capillari. La separazione dei frammenti è determinata da un particolare polimero, che il sequenziatore preleva attraverso una pompa

(polymer delivery pump, PDP). Il polimero viene iniettato all'interno dei capillari. In prossimità della PDP si trova l'anodo del sequenziatore, immerso nel running buffer, mentre il catodo è all'interno dell'autosampler. Quando la corsa elettroforetica viene avviata, la PDP inizia a introdurre il polimero nei capillari, mentre l'autosampler si muove per immergere i capillari prima nel running buffer, poi nei primi 16 campioni di DNA. Il DNA inizia a migrare lungo il capillare, incontrando la resistenza delle maglie del polimero. Durante la corsa elettroforetica i frammenti di DNA si dispongono lungo il capillare dal più breve, che supera più facilmente le maglie e perciò migra più rapidamente, al più lungo, che ha minore velocità di migrazione. Anche una differenza di lunghezza di una sola base determina una diversa velocità di migrazione. I frammenti giungono così in successione alla cella di rilevamento, dove i ddNTP irradiati emettono la fluorescenza specifica della base, registrata dal sequenziatore. Terminata la corsa il computer associato al sequenziatore elabora l'elettroferogramma che permette di leggere la sequenza.

5.3 Real-time PCR

La real-time polymerase chain reaction, detta anche Quantitative PCR (qPCR), è una tecnica di laboratorio, basata sulla PCR classica, che permette di seguire la cinetica di una reazione di amplificazione del DNA in tempo reale. Le sue applicazioni sono molteplici. Sfruttando le proprietà delle molecole fluorescenti, i fluorocromi, con la real-time PCR è possibile calcolare la quantità iniziale di DNA stampo presente prima del saggio.

I fluorocromi possono essere utilizzati in due modi diversi nella real-time PCR. Alcune molecole fluorescenti come il SyberGreen sono anche leganti del DNA ed emettono fluorescenza solo quando sono associate al dsDNA,

intercalate tra le coppie di basi. Pertanto, l'aumento delle molecole di DNA amplificate determinerà un incremento della fluorescenza rilevata, tuttavia senza alcuna specificità per un particolare DNA stampo. La molecola si legherà infatti a qualunque dsDNA. Per questa ragione, l'allestimento di una real-time PCR che utilizza queste molecole è indicato quando il campione di DNA è omogeneo. Le tecniche come la chimica SyberGreen sono utili, ad esempio, nei saggi di espressione genica per valutare la quantità di cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione di mRNA.

Quando invece il campione di DNA è una miscela di molecole diverse ed è necessario poter rilevare l'amplificazione di una particolare sequenza nucleotidica rispetto ad un'altra, la tecnica della real-time che viene adoperata è basata sulla chimica TaqMan. La componente che caratterizza questa tecnica è la sonda TaqMan (fig.), un particolare oligonucleotide progettato per essere perfettamente complementare alla sequenza di una regione distintiva del DNA stampo di cui si valuta la quantità o semplicemente la presenza.

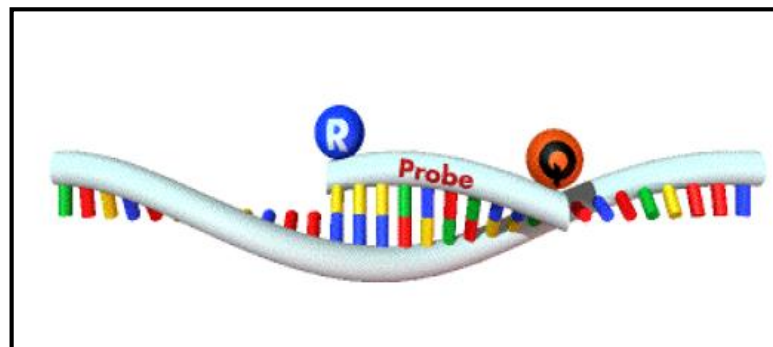


Figura 1. Sonda TaqMan.

All'estremità 5' e 3' della sonda sono coniugate con legame covalente due molecole che, pur essendo estremamente variabili nella loro composizione chimica, sono sempre identificate con i nomi di Reporter e Quencher. Il Reporter

è un fluorocromo mentre il Quencer è una molecola che diminuisce l'intensità di fluorescenza di un fluorocromo. Quando un elettrone del fluorocromo assorbe una certa quantità di energia passa dallo stato fondamentale, a minore energia, a quello eccitato, a energia maggiore; l'elettrone ritorna allo stato energetico fondamentale liberando una quantità di energia pari alla differenza tra i due livelli energetici. Inizialmente l'elettrone cede energia vibrazionale e il rilassamento dello stato eccitato libera calore. L'energia rimanente è ceduta con l'emissione di un fotone, generando il fenomeno della fluorescenza. Perché il fenomeno si verifichi, è necessario che la molecola assorba una radiazione con un'energia pari alla differenza tra lo stato fondamentale e quello eccitato. La radiazione emessa ha energia inferiore. Il Quencer è una molecola che ha energia di assorbimento pari a quella del fotone emesso nella fluorescenza del Reporter. La distanza alla quale sono posti Reporter e Quencer nella sonda, pari alla distanza che separa le estremità 5' e 3' dell'oligonucleotide, è sufficiente perché si verifichi un fenomeno denominato Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET).

Questo fenomeno fisico consiste nel trasferimento non radiattivo di energia tra due molecole. L'energia del fotone emesso durante la fluorescenza dal fluorocromo, è assorbita per eccitare l'elettrone di un'altra molecola. Così, anche se il Reporter assorbe la quantità di energia sufficiente, la sua fluorescenza è "catturata" dal Quencer (fig.). Nella Real-time PCR le caratteristiche della sonda TaqMan si combinano con le funzioni enzimatiche della DNA polimerasi. Durante i cicli di amplificazione, nella fase di ibridazione oltre ai primer necessari per la sintesi del DNA si appaiano anche le sonde TaqMan, in una regione dello stampo che cade all'interno della sequenza duplicata. Nella fase di amplificazione, la DNA polimerasi, incorporando i nucleotidi in direzione 5'-3' per la sintesi del filamento

nascente, si sposta sul filamento stampo fino a raggiungere la sonda. La polimerasi, attivando la funzione enzimatica di esonucleasi 5'-3', idrolizza la sonda TaqMan, liberando in soluzione i nucleotidi, il Reporter e il Quencer (fig.7).

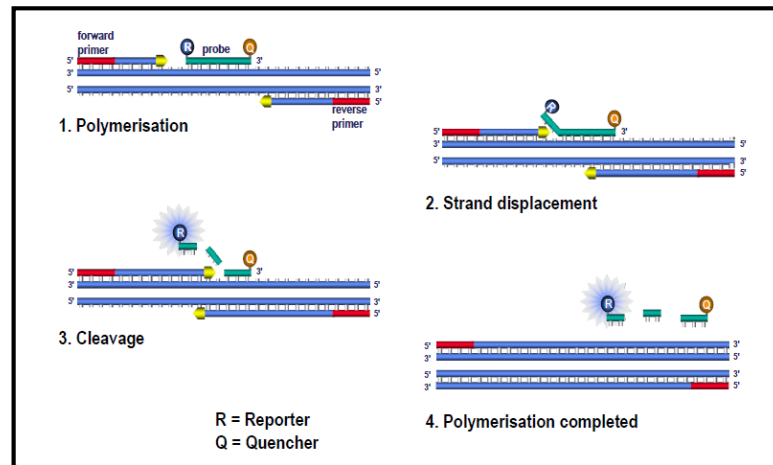


Figura Meccanismo della sonda TaqMan.

Le due molecole, non più vincolate alla sonda, sono separate e il fenomeno della FRET non si verifica. Il reporter, assorbendo l'energia del laser irradiato dallo strumento, emette fluorescenza che viene rilevata e registrata. Pertanto la quantità di radiazioni fluorescenti prodotte aumenta proporzionalmente alla sintesi del DNA. Se invece il filamento di DNA non viene amplificato, la sonda TaqMan rimane integra e il fenomeno della FRET impedisce l'emissione di fluorescenza del Reporter. In questo modo la variazione della fluorescenza è dipendente dalla cinetica di amplificazione.

La fluorescenza rilevata è registrata dallo strumento e il relativo software restituisce un grafico che ne indica l'andamento da un ciclo all'altro. La reazione a catena della polimerasi si verifica secondo una cinetica esponenziale, in base alla quale il numero di copie di DNA raddoppia ad ogni ciclo di amplificazione. L'aumento del numero di copie in funzione dei cicli di amplificazione, espresso in scala logaritmica, descrive dunque una retta.

Tuttavia durante i primi cicli di amplificazione il numero di sonde degradate è esiguo e la fluorescenza emessa è minima. Quando viene raggiunto un numero di copie sufficiente, lo strumento inizia a rilevare la fluorescenza, che aumenta gradualmente. Dopo un certo numero di cicli, la fluorescenza è direttamente proporzionale ai cicli trascorsi e rispecchia la cinetica della reazione di amplificazione. Superati i 30 cicli di amplificazione, l'attività enzimatica della polimerasi decresce e i nucleotidi si esauriscono; in questa fase, definita *plateau*, la fluorescenza aumenta sempre più lentamente, fino a mantenersi su un valore limite. Queste fasi determinano la cinetica caratteristica della RT-PCR, espressa dalla curva detta sigmoide (fig 8).

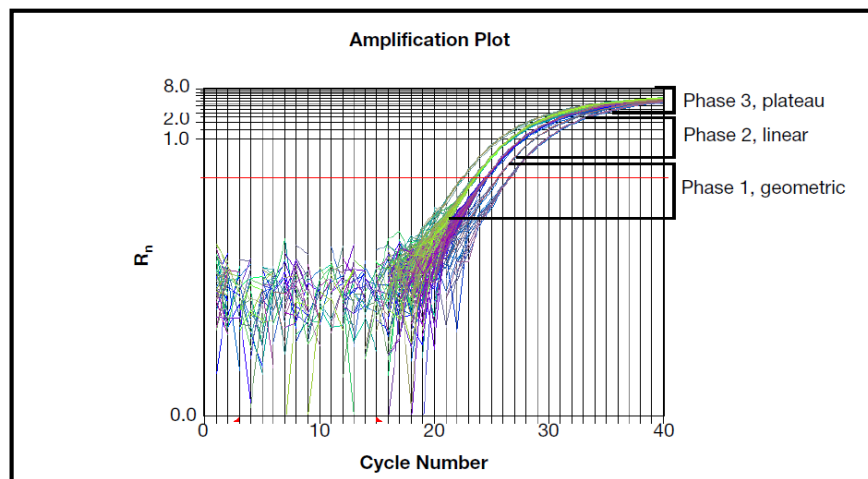
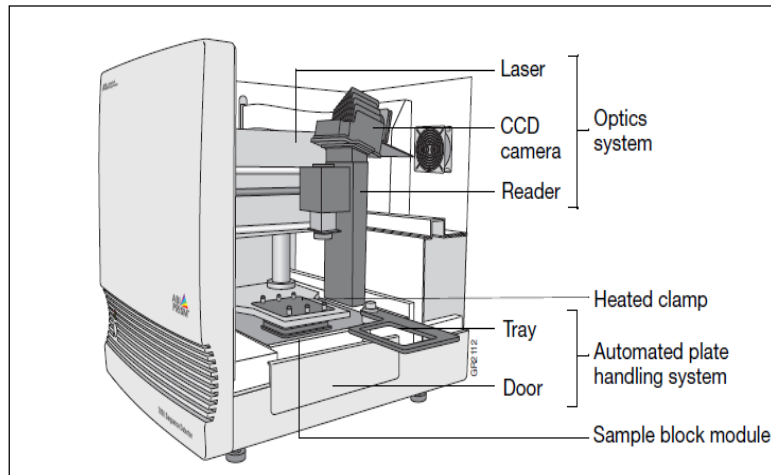


Figura 2. Cinetica della Real-Time PCR.

Il rapporto tra la concentrazione del DNA stampo e la fluorescenza rilevata si mantiene costante durante la fase esponenziale, ma varia sempre più man mano che la reazione si avvicina alla fase di plateau.

Lo strumento utilizzato è un termociclatore per Real-Time PCR. I campioni da analizzare sono caricati su una piastra da 96 pozzetti (fig.), che viene sigillata con un adesivo ottico e inserita nello strumento. Lo strumento è

costituito da componenti per realizzare i cicli a temperature diverse e da un sistema ottico per rilevare la fluorescenza (fig.).



Un blocco per il campione (sample block module) riscalda i campioni della piastra secondo il programma impostato per la PCR. Il caricamento della piastra è gestito da un sistema automatico, costituito da un supporto mobile (tray), posto sopra il sample block. Quando il supporto è richiamato dal software, ruota verso l'esterno, permettendo all'operatore di posizionare la piastra; successivamente ruota verso l'interno, ritornando alla posizione iniziale e collocando la piastra sopra il sample block. Dopo che la piastra è stata caricata, un coperchio riscaldato (heated clamp) esercita su di essa una pressione verso il basso perché aderisca al sample block; in questo modo il trasferimento di calore dal blocco alla piastra è più efficiente e uniforme durante i cicli di reazione. Inoltre l'heated clamp mantiene sopra la piastra una temperatura costante di $\sim 105\text{ }^{\circ}\text{C}$, prevenendo l'evaporazione del campione e la formazione di condensa sull'adesivo ottico.

I principali componenti del sistema ottico sono una fonte di luce, che emette un raggio laser, e un rilevatore della fluorescenza (fig.).

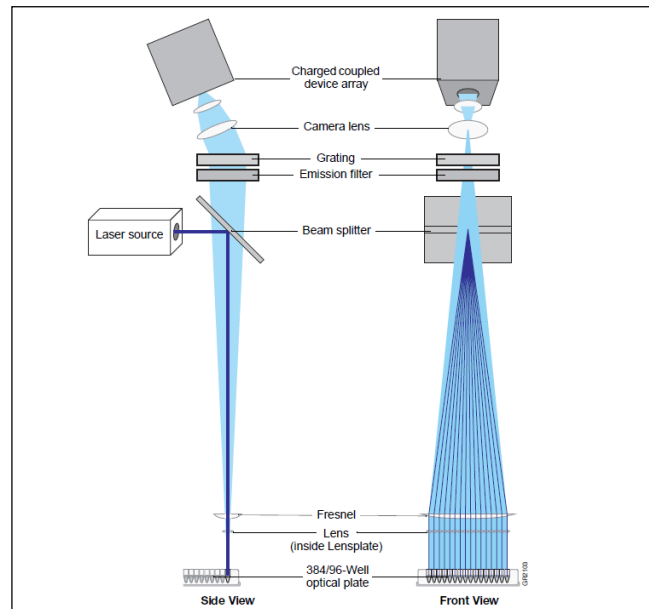


Figura 3. Sistema ottico dello strumento.

Durante la reazione di PCR, il laser a ioni di argon emesso dalla fonte luminosa è scomposto in fasci di luce diversi da un separatore di raggio (beam splitter). Il separatore direziona i raggi sui pozzetti della piastra e i fluorocromi presenti nei campioni emettono fluorescenza. La fluorescenza emessa da ogni pozzetto è focalizzata da un sistema di lenti, filtri e specchi su un particolare reticolo (grating), che separa i fasci di luce in base alla lunghezza d'onda, secondo uno schema particolare. I raggi di luce separati dal reticolo raggiungono il rilevatore della fluorescenza chiamato Charged Coupled Device Camera (CCD-camera). Un CCD, o dispositivo a carica accoppiata, è un circuito costituito da una griglia di elementi che, sollecitati da un'onda elettromagnetica, emettono un impulso elettrico proporzionale all'intensità della radiazione. Dunque la CCD-camera converte la fluorescenza rilevata in un'informazione digitale, registrata dallo strumento.

Capitolo VI - Tecnica di prelievo dei campioni

Esistono differenti tecniche di prelievo che possono essere impiegate per ottenere campioni su cui andare a ricercare tali mutazioni: tecniche citologiche, di più semplice esecuzione, con minori rischi per il paziente e tecniche per prelievo di campioni istologici, spesso più complesse da eseguire, con maggiori rischi per il paziente ma con maggiori quantità di tessuti su cui effettuare la ricerca genica della mutazione.

6.1 Toracentesi

La **toracentesi** è una procedura diagnostica/terapeutica efficace sia nel determinare l'eziologia che nel migliorare il quadro sintomatico (dispnea). Il riscontro di cellule tumorali nel liquido pleurico in un paziente con VP associato a tumore del polmone consentirà di stadiare il paziente ad uno stadio IV (M1a Pldissem) ⁴¹.

Va tuttavia ricordato che esiste un'ampia variabilità nella resa diagnostica della citologia del liquido pleurico attestandosi su valori oscillanti dal 62% al 90%⁴²⁴³. La toracentesi permette di prelevare un campione di liquido pleurico per le indagini chimico/fisiche e citologiche nonché, qualora necessario, posizionare un drenaggio toracico.

Consiste nell'introduzione di un ago nel cavo pleurico attraverso la parete toracica. Si distinguono 2 tipi di toracentesi:

- ✓ diagnostica o esplorativa che ha lo scopo di prelevare piccole quantità di liquido pleurico 20-25 ml per le analisi in laboratorio;

⁴¹Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The new lung cancer staging system. Chest 2009;136:260-271

⁴²Loddenkemper R. Thoracoscopy – state of the art. Eur. Respir J 1998;11:213-221.

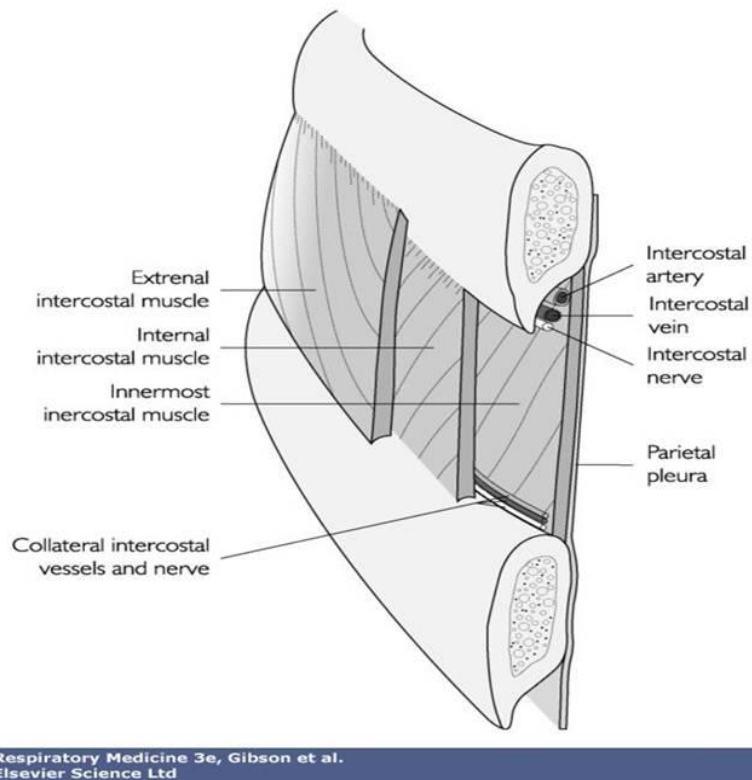
⁴³Prakash UB, Reiman HM. Comparison of needle biopsy with cytologic analysis for the evaluation of pleural effusion: analysis of 414 cases. Mayo ClinProc 1985;60:158-164.

- ✓ toracentesi evacuativa, che ha lo scopo di svuotare il cavo per migliorare la sintomatologia, permettere la guarigione o semplicemente a scopo palliativo per migliorare la qualità della vita di pazienti in fase terminale.

Non esistono controindicazioni assolute, tuttavia è consigliabile non eseguire la procedure in caso di:

- ✓ versamenti esigui con distanza tra il margine del versamento e la parete toracica <1cm all'rx in decubito laterale
- ✓ difetti della coagulazione o uso di anti coagulanti(dicumarolici) o antiaggreganti:
 - PLT<25.000/mm³
 - INR o APTT aumentati piu' di due volte la norma (INR v.n. 1 APTT v.n.25-35 sec.)
 - insufficienza renale grave
- ✓ necessita' di ventilazione meccanica
- ✓ infezioni cutanee in fase attiva nel sito di inserzione dell'ago di toracentesi

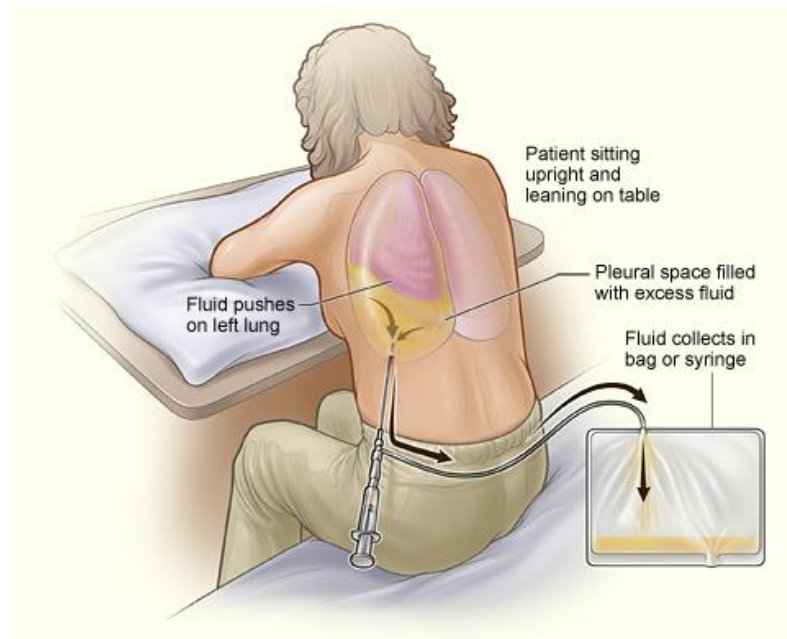
Si procede all'identificazione del sito di inserzione dell'ago, anche ove necessario, con l'utilizzo dell'ecografia del torace. Di norma il paziente deve essere messo seduto dritto con le braccia alzate a livello del capo e poggiate in avanti su un supporto. La procedura prevede l'utilizzo di un anestetico locale (lidocaina). Il sito d'inserzione in genere è nel punto di mezzo tra la colonna vertebrale e la linea del suono ottuso a coscia, ma mai più basso della IX costa. L'ecografia permette di identificare il sito con maggiore precisione ed è di aiuto nei casi difficili. L'ago deve procedere appoggiato sul margine superiore della costa che delimita inferiormente lo spazio intercostale scelto.



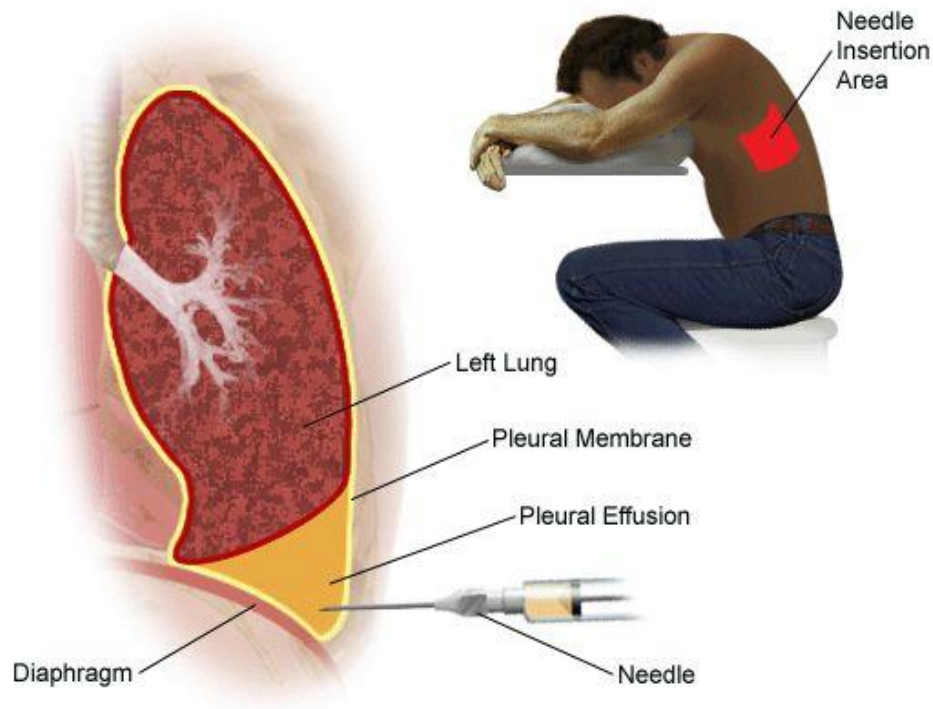
Cio' diminuisce il rischio di lesione dei vasi e nervi intercostali che decorrono in prossimita' del margine inferiore della costa soprastante.

Nel caso di VP massivi, questi devono essere drenati in maniera controllata al fine di ridurre al minimo i possibili rischi per il paziente come, ad esempio, l'edema polmonare da riespansione polmonare⁴⁴.

⁴⁴Tan C, Sedrakyan A, Browne J, Swift S, Treasure T. The evidence on the effectiveness of management for malignant pleural effusion: a systematic review. *Eur J CardiothorSurg*2006;29:829-838.



Example of Thoracentesis



E' opportuno terminare la procedura quando:

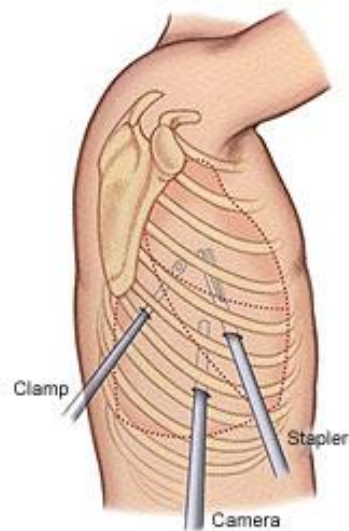
- si avverte il polmone che sbatte sulla punta dell'ago e l'aspirazione diviene difficoltosa;
- si è prelevato un volume di circa 1500 ml: al di sopra di tale volume il paziente può avvertire problemi derivanti da un espansione troppo rapida del polmone (edema polmonare da riespansione troppo rapida);
- il paziente è sintomatico per l'insorgenza di tosse, dispnea, sudorazione, pallore oppure è irrequieto;
- si evidenzia drenaggio di aria.

La complicanza più frequente, riscontrata nel 12-30% delle procedure, è lo PNEUMOTORACE. Altre complicanze più rare ma comunque temibili sono anche: sanguinamenti, puntura di fegato o milza, l'infezione del cavo pleurico, crisi vagali, insemminazione della parete toracica con cellule tumorali.

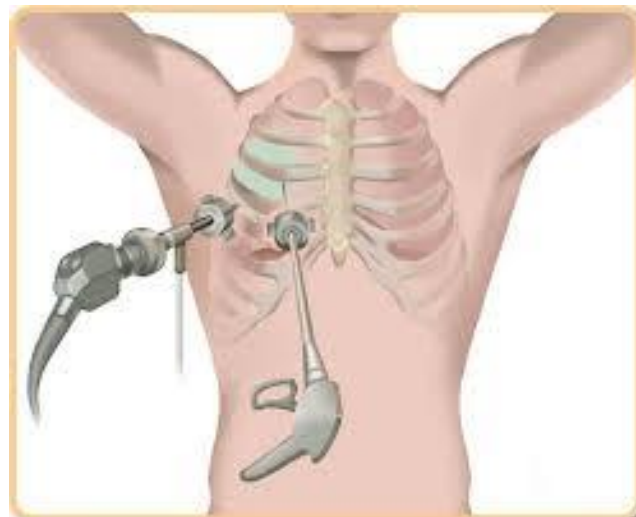
Nella gestione clinica di un paziente con un VP maligno spesso si rendono necessarie più sedute di T.O. (TORACENTESI OPERATIVA): questa linea comportamentale costituisce il trattamento di scelta nella palliazione dei sintomi in quei pazienti con breve aspettativa di vita. Durante una seduta di T.O. la quantità di liquido da drenare andrà valutata ogni volta in base alla sintomatologia (tosse, sensazione di fastidio o disagio al torace) e non deve superare i 1500-2000 ml/24 ore. Tuttavia, la probabilità che entro un mese si presenti una recidiva del versamento dopo semplice T.O. è di fatto del 100%. A tal proposito, è da consigliare il posizionamento di drenaggio toracostomico con l'obiettivo di evitare ripetute T.O.

6.2. Vats e Versamenti Pleurici

Per la diagnosi di versamenti pleurici di origine sconosciuta, la VATS con tre accessi (a) è la tecnica che per prima fu utilizzata. Biopsie pleuriche possono essere effettuate con l'uso di pinze da endoscopia o, eventualmente, un accettabile metodo alternativo consiste nel circondare la lesione pleurica sospetta lasciando un ampio margine e poi prelevare il frammento di tessuto, contenendolo con una pinza. Se è possibile determinare immediatamente che il versamento pleurico è causato da una patologia maligna, va effettuata contestualmente la pleurodesi chimica mediante insufflazione di talco.



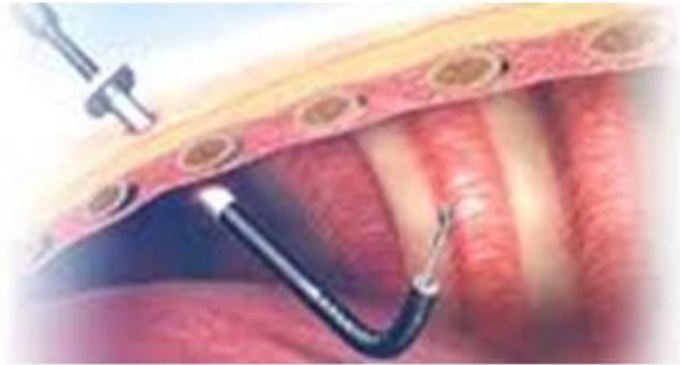
a)VATS 3-port



b)VATS 2-port

In realta' dalla pratica clinica si vide come l'uso di 2 port (b), uno per la camera e l'altro per la pinze da biopsia, o di un singolo accesso, potesse essere sufficiente ad ottenere campioni di tessuto pleurico. Da qui nasce l'idea di codificare una tecnica VATS con l'utilizzo di un singolo accesso e l'utilizzo di strumentario tecnico espressament studiato per questo scopo.

6.3. Awake Single Port V.A.T.S.



La video-toracosopia in mono accesso rappresenta quindi un'evoluzione della tradizionale VATS 3-port. Il vantaggio principale di questa tecnica è che può essere eseguita in anestesia locale con conseguenti numerosi vantaggi:

- ✓ Riduzione del dolore postoperatorio,
- ✓ Riduzione del tempo di degenza ospedaliera,
- ✓ Rapido miglioramento post-operatorio,
- ✓ Riduzione dei costi,
- ✓ Miglior risultato estetico.

Controindicazioni assolute a questa tecnica sono:

- instabilità emodinamica,
- pazienti già intubati e ventilati,
- anticipata esigenza di eseguire una decorticazione pleurica,
- necessità di effettuare dissezioni mediastiniche,
- versamenti pericardici con un coesistente e massivo versamento pleurico.

Tutti gli altri pazienti con un massivo versamento pleurico unilaterale, empiema e patologie pleuriche diffuse sono invece candidabili per un'anestesia locale più sedazione. Nessun paziente viene escluso in base all'età o ad eventuali comorbidità.

Il paziente viene sedato con una iniziale combinazione di midazolam, fentanyl e propofol. Un supplemento di ossigeno viene somministrato mediante maschera, monitorando sempre la saturazione dell'ossigeno, ECG e pressione arteriosa. All'anestetico locale, a livello dello spazio intercostale prescelto per l'inserimento del trocar, si può associare un'anestesia loco regionale tramite l'infusione di miscele di anestetici a livello delle radici nervose del tratto toracico interessato. I muscoli intercostali e la pleura possono essere infiltrati sotto diretta visione o palpazione attraverso l'incisione.



6.3.1 Tecnica chirurgica

Dopo la sedazione il paziente viene posizionato in decubito laterale, con l'emitorace da trattare disposto superiormente e il tronco posto su un piano lievemente sollevato; un piccolo materasso antidecubito viene posizionato sotto in modo da ottenere un lieve allargamento degli spazi intercostali.

The lateral thoracotomy position

The patient is stabilized by a comfortable mattress. Note the 'bridge' raised in the operating table, directly below the chest, to aid surgical access



From: J W W Gothard. *Anaesthesia for thoracic surgery*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1992

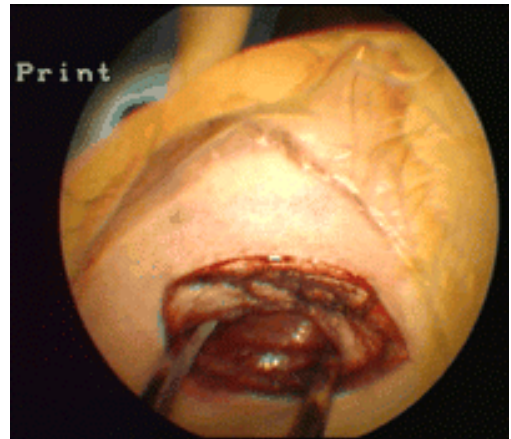
L'utilizzo dell'ecografia nella scelta del sito di accesso costituisce un metodo rapido e sicuro che permette la visualizzazione del versamento e guida l'operatore nella scelta del punto in cui inserire il trocar, evidenziando zone di importante ispessimento pleurico o eventuali raccolte empiematose o pluriconcamerate.

Il principio alla base della scelta del sito d'introduzione è:

- a) il sito di accesso deve essere lungo un piano sagittale (generalmente tra la linea ascellare media e anteriore);
- b) deve essere garantita una certa distanza tra il sito di inserimento del trocar e l'area da trattare per evitare interferenze nella visualizzazione del cavo pleurico da parte del toracoscopio e degli altri strumenti utilizzati;
- c) il chirurgo operatore deve ricavare il maggior vantaggio nell'uso dello spazio intercostale per evitare la creazione di zone non raggiungibili dovuti all'ostacolo posto dalla costa superiore o inferiore.

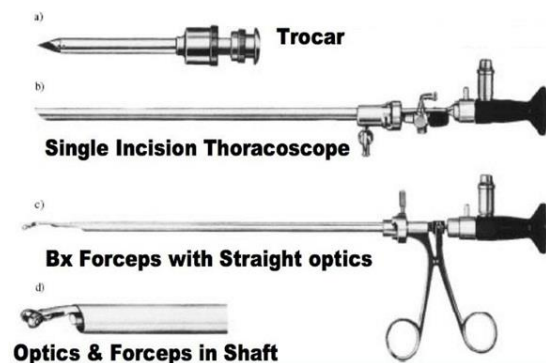
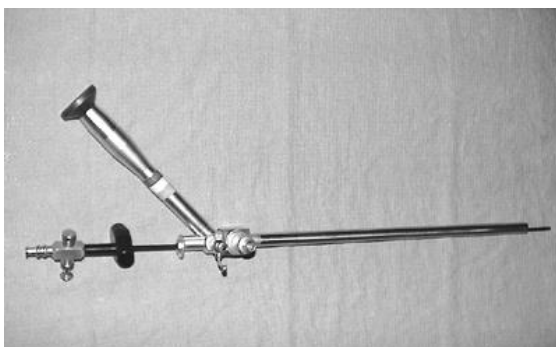
Nella scelta della sede di accesso, occorre porre attenzione ad alcune aree definite *“hazardous area”*: arteria mammaria interna, regione ascellare con l’arteria toracica laterale, regione infraclavicolare con l’arteria succlavia. Se si sceglie uno spazio intercostale troppo basso c’è un forte rischio di lesioni diaframmatiche e/o spleniche.

Si procede quindi all’incisione, di circa 10-25 mm e con la dissezione dei piani muscolo-fasciali estendendosi fino al margine superiore della costa. A questo punto si è creato lo spazio sufficiente per consentire l’ingresso del dito del chirurgo per esplorare la cavità e valutare la presenza di eventuali aderenze. Viene quindi introdotto il trocar per inserire il video toracoscopio (toracoscopio rigido con un canale operatorio di 9 mm).



Gli strumenti utilizzati sono:

- Fonte luminosa (HD, recording);
- Toracoscopio rigido con un canale di lavoro di 9 mm;
- Altri strumenti: pinze da biopsia, aghi da biopsia, un catetere da aspirazione attraverso il canale operatorio, che consenta anche l’elettrocauterizzazione (o laser).



Dopo l'inserimento del trocar, l'accesso al cavo pleurico e il prelievo di liquido per eventuali esami chimico-fisico, batteriologico e citologico, si procede al drenaggio del liquido pleurico. In corso di intervento chirurgico e a meno di una condizione di emergenza, il versamento non viene drenato per favorire il collassamento del polmone. In caso di mancato collassamento del parenchima polmonare può essere utile creare un pneumotorace tramite l'insufflazione di diversi centimetri cubi di co2. Al drenaggio del fluido presente segue l'ispezione del cavo pleurico: si procede ad una attenta esplorazione dell'intero cavo pleurico compresi tutti i recessi pleurici, previa lisi di eventuali aderenze e sbrigliamento di raccolte empiematose organizzate. In presenza di aree sospette si procede a biopsie multiple, anche in caso di chiara visualizzazione delle lesioni, per evitare il rischio di un prelievo non diagnostico e aumentare la sensibilità della tecnica.



6.3.2 Complicanze

L'incidenza di complicanze in seguito a VATS single port con il ricorso all'anestesia loco regionale è di circa il 10% complessivamente. Il tasso di mortalità è del 1% Altre complicanze possono essere:

- Enfisema sottocutaneo 0,5%;
- Sanguinamento <1%;
- Aritmia cardiache benigne <5%;
- Ipotensione moderata <10%;
- Lieve ipertermia 15%;
- Prolungato air leak (complicanza più frequente) 3,2-6,7%;
- Versamento pleurico 0,7%;
- Polmonite 0,5%;
- Disseminazione tumorale;

Capitolo VII – Esperienza Personale

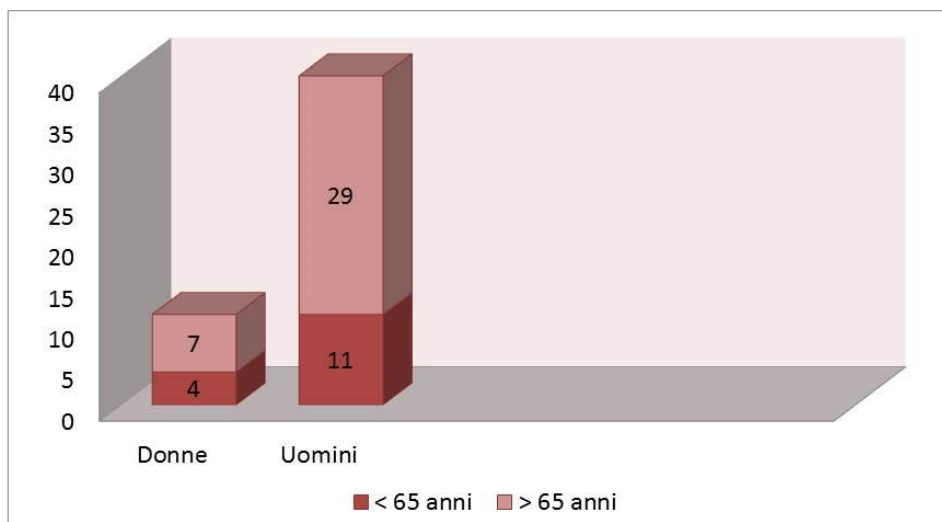
7.1 Materiale e Metodi

Dal 2010 al Settembre 2013 sono stati sottoposti toracentesi diagnostiche, biopsie trans-toraciche, broncoscopia e trattamento in VATS o Single Port VATS con prelievo bioptico 46 pazienti affetti da una patologia di tipo neoplastico primitiva polmonare con versamento pleurico maligno. I campioni citologici prelevati tramite toracentesi, ago aspirato, brushing, bronco aspirato e quelli istologici prelevati tramite VATS o Single Port VATS, biopsie trans bronchiali e transtoraciche sono stati analizzati e su tali campioni è stata effettuata la valutazione dello stato mutazionale di EGFR ai fini del possibile utilizzo delle terapie monoclonali con TKI (erlotinib e gefitinib).

Dei 46 pazienti:

- 11 erano donne (7 di età > 65anni, 4 di età < 65anni);
- 35 uomini (29 di età >65anni; 11 di età <65 anni).

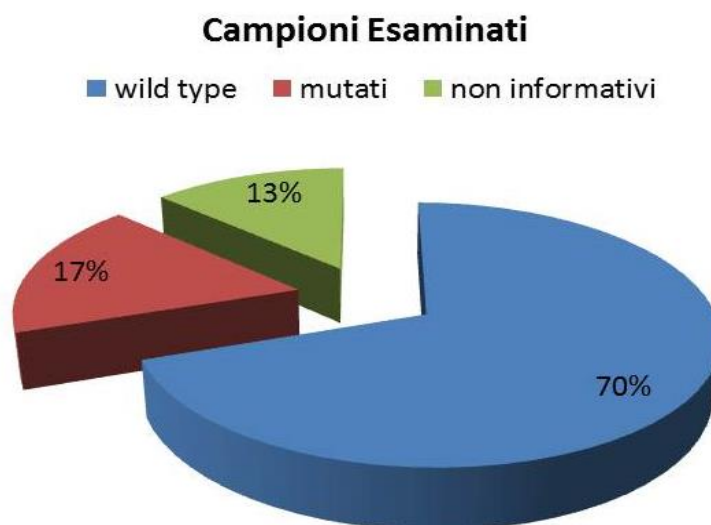
Pazienti con Adenocarcinoma e Versamento Pleurico Maligno



La cellularità neoplastica nei vari campioni istologici prelevati varia dal 3% al 90%. I campioni esaminati sono risultati:

- ✓ Wild type in 32 campioni su 46 (70%);
- ✓ Non informativi per l'analisi mutazionale in 6 campioni su 46 (13%);
- ✓ Mutati 8 su 46 (17%)

Mutazione trovata	Cellularità Neoplastica	Tipo di campione	sexso
Esone 21 L858R	10%	Istologico	M
Esone 21 L858R	30%	Istologico	F
Esone 19 (delezione)	20%	Istologico	M
Esone 19 (delezione)	30%	Istologico	F
Esone 19 (delezione)	90%	Istologico	F
Esone 19 (delezione)	50%	Istologico	M
Esone 19 (delezione)	40%	Istologico	M
Inserzione esone 20 (di resistenza)	3%	Istologico	M



Mutazione trovata	Cellularità Neoplastica	Tipo di campione	sexso
Esone 21 L858R	2%	Liquido pleurico	M
Esone 21 L858R	5%	Ago aspirato	F
Esone 19 (delezione)	30%	Liquido pleurico	M
Esone 19 (delezione)	10%	Liquido pleurico	M
Esone 19 (delezione)	20%	Liquido pleurico	M
Esone 19 (delezione)	10%	Brushing	F
Esone 19 (delezione)	50%	Liquido pleurico	F

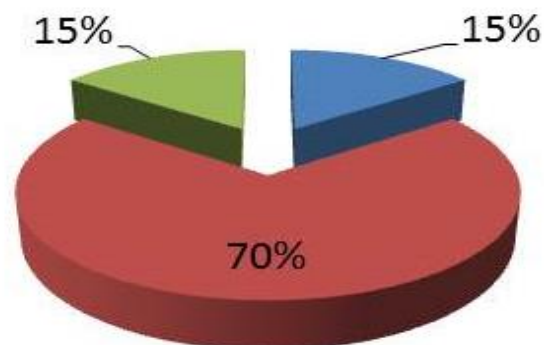
Nei campioni citologici la cellularità neoplastica variava dal 2% al 50%. Di questi :

- Non informativi 7 (15%)
- Mutati 7 (15%)
- Wild Type 32 (70%)

Citologico

- Campione Citologico Non Informativo
- Campione Citologico Wild Type

■ Campione Citologico Mutato



CONCLUSIONI

Ponendo a confronto i risultati di laboratorio sull'assetto mutazionale del gene EGFR ottenuti dall'analisi di campioni citologici e istologici, migliori risultati si sono avuti ancora una volta dai campioni istologici prelevati tramite broncoscopia, biopsia transtoracica e VATS. Sebbene vi siano molti vantaggi che la toracentesi offre in termini di potenziale diagnostico e semplicità di esecuzione, i campioni ottenuti ed esaminati non risultano ancora pienamente soddisfacenti.

Tale discrepanza deriva soprattutto:

- Dalla necessità che i campioni di cellule, se si utilizza l'analisi mutazionale standard (sequenziamento diretto), contengano oltre 200⁴⁵ cellule tumorali. Infatti sono state utilizzate anche quantità inferiori di cellule tumorali, ma quando il numero scende al di sotto delle 100 unità aumenta il rischio di ottenere un risultato di falso negativo per lo stato mutazionale di EGFR⁴⁶.
- Nei laboratori italiani la metodica di sequenziamento più utilizzata è ancor oggi il sequenziamento diretto di Sanger. Infatti la real time PCR non è ancora così largamente disponibile sul territorio.
- Dalla necessità di una maggior cura nella preparazione del campione da analizzare. Infatti vengono utilizzate metodiche diverse in relazione alla metodica utilizzata per il prelievo:
 - Striscio diretto per i campioni provenienti da brushing bronchiale e agoaspirato fine;
 - Centrifugazione per i campioni provenienti da aspirazioni e lavaggi bronco alveolari e da versamenti pleurici;

⁴⁵ Pirker R et al. J Thorac Oncol 2010;5:1706-1713

⁴⁶ Savic S et al. British journal of cancer 2008;98: 154-160

- citoincluso per i campioni di espettorato, versamento pleurico e Bal.

Per cui entrano in gioco anche eventuali errori operatori dipendenti.

Da ciò si evince, dunque, che nonostante la toracentesi possa rappresentare una metodica meno invasiva, di facile esecuzione, ben tollerata e con una bassa percentuale di complicanze per il prelievo di materiale su cui effettuare diagnosi molecolare, essa non può sostituire in toto la toracosopia o la VASTS quando la biopsia transbronchiale risulta non diagnostica.

Allo stesso modo, nel trattamento dei versamenti pleurici maligni la metodica dell' AWAKE SINGLE PORT V.A.T.S. si conferma un ottimo strumento sia diagnostico che terapeutico nel management dei versamenti pleurici benigni e maligni. La tecnica ha dato infatti ottimi risultati con un tasso di mortalità pari allo 0%. Dall'analisi degli endpoints presi in considerazione è emerso che, rispetto alla tradizionale VATS 3-port, si ha una riduzione dei giorni di ricovero post-operatorio, riduzione del tempo di mantenimento del drenaggio, riduzione della percentuale di complicanze (totali, intra- e post-operatorie) e della percentuale di recidive del versamento dopo VATS Single Port.

Da un punto di vista diagnostico ha inoltre fornito, in una buona percentuale di casi 27% (7 casi sui 26 idonei per analisi mutazionale), un campione adeguato per l'analisi mutazionale senza alterare le prospettive di prognosi del paziente.

In ogni campione sono stati analizzati gli esami 18, 19, 20 e 21 del gene EGFR, dando la preferenza, qualora il materiale fosse esiguo, agli esoni 19 e 21 le cui mutazioni sono predittive positive o di risposta alla terapia con TKI; in secondo luogo, all'esone 18 che fornisce sempre una predittività di risposta alla terapia ma in una percentuale inferiore, e infine al 20 che può riportare la mutazione predittiva negativa (resistenza al trattamento con TKI).

La nostra esperienza ha confermato le percentuali di mutazioni piu' frequentemente riscontrate *in primis* 19, seguita dal 21 e dal 20.

Dai casi analizzati si nota chiaramente come la maggior parte dei campioni derivi da prelievi bioptici piuttosto che citologici, in quanto è dai primi che si ottiene una maggiore quantità di tessuto disponibile e tanto maggiore è la quantità tanto più affidabile sarà la diagnosi molecolare. Inoltre, frequentemente si effettuano indagini fibrobroncoscopiche in pazienti con tumore polmonare sospetto o confermato. L'approccio broncoscopio infatti rientra nell'iter diagnostico necessario per la stadiazione clinica del paziente che precede l'eventuale intervento chirurgico, qualora questi venga ritenuto operabile. Anche nei casi di malattia in stadio avanzato la broncoscopia trova il suo razionale perché non solo è d'aiuto nel definire lo stadio, ma, consentendo prelievi bioptici, può completare il quadro clinico del paziente, offrendo inoltre la possibilità di un'indagine molecolare che possa accertare la presenza di mutazioni dall'importante risvolto clinico e soprattutto terapeutico.

Il liquido pleurico, d'altra parte, come ampiamente documentato in letteratura, mostra una sua validità:

- può rappresentare l'unico tipo di campione reperibile per i pazienti in stadio avanzato di patologia (IIIB, IV)
- molti studi⁴⁷ hanno mostrato che i campioni di DNA prelevati dal liquido pleurico sono una valida alternativa a quelli delle altre metodiche.

⁴⁷ Hideharu Kimura,1,2 Yutaka Fujiwara,3 Takashi Sone,2 Hideo Kunitoh,3 Tomohide Tamura,3 Kazuo Kasahara2 and Kazuto Nishio1,4,5,6EGFR mutation status in tumor-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting the response to Gefitinib 2006 Nov 14

Tuttavia dalla nostra esperienza, i campioni ottenuti dalla citologia non sono stati adeguati come i campioni citologici per cui al momento la possibilità che si raccolgano liquidi pleurici, come unica fonte di riferimento per la ricerca mutazionale, è circoscritta a quei casi con stadio molto avanzato di malattia.

BIBLIOGRAFIA

Abbruzzese JL, Abbruzzese MC, Hess KR, et al : Unknown primary carcinoma: natural history and prognostic factors in 657 consecutive patients. J Clin Oncol, 1994

Ann Oncology, 2012 jul9 An evaluation study of EGFR mutation tests utilized for non small cell lung cancer in the diagnostic setting

Anthony VB. Pathogenesis of malignant pleural effusions and talc pleurodesis. Pneumologie 1999

Anthony V, Loodenkemper R, Astoul P, Boutin C, Goldstraw P, Hott J. Management of malignant pleural effusions. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2000

Antony V.B., Loodenkemper R., Astoul P., Boutin c., Goldstraw P., Hott J., Rodriguez-Panadero F. e Sahn S.A. Management of malignant pleural effusions , EurRespir.J. , 2001

Bosari S, Marchetti A, Buttitta F, Graziani D, Borsani G, Loda M, Bevilacqua G, Coggi G. Detection of p53 mutations by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) gel electrophoresis. A comparative study of radioactive and nonradioactive silver-stained SSCP analysis. Diagn Mol Pathol. 1995; Fanet al 2001

Breathnach OS, Freidlin B, Conley B, Green MR, Johnson DH, Gandara DR, O'Connell M, Shepherd FA, Johnson BE. Twenty-two years of phase III trials for patients with advanced non-small-cell lung cancer: sobering result. J Clin Oncol: 2001

BTS guidelines for the investigation of a unilateral pleural effusion in adults Thorax, 2003

BTS Pleural Disease Guideline 2010 – Thorax, 2010

Chernow B, Sahn SA: Carcinomatous involvement of the pleura : an analysis of 96 patient. Am J Med, 1977

Cohen S, Hossain SA. Primary carcinoma of the lung: a review of 417 histologically proved cases. Dis Chest 1966

Cusumano G., Margaritora S., Porziella V. et al: Ann. Ital. Chir., 2007

Dahse R., Berndt A., Kosmehl H, Hartwig: PCR-based Testing for therapy-related EGFR Mutations in patients with Non- Small Cell Lung Cancer. HELIOS Clinic Erfurt, institute of Pathology, Erfurt; Friedrich Shiller University Jena, Institute of Pathology, Jena, Germany

Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The new lung cancer staging system. Chest 2009

Emad A, Rezaian G. Treatment of malignant pleural effusions with a combination of bleomycin and tetracycline. Cancer 1996

Emerg Med Clin N Am 28, 2010

Fenton KN, Richardson JD: Diagnosis and Management of Malignant Pleural Effusion. Am J Surg, 1995

Franklin WA, Veve R, Hirsch FR, Helfrich BA, Bunn PA., Jr Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. Semin Oncol. 2002

Han SW, Kim TY, Hwang PG, Jeong S, Kim J, Choi IS, Oh DY, Kim JH, Kim DW, Chung DH, Im SA, Kim YT, Lee JS, Heo DS, Bang YJ, Kim NK. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. J Clin Oncol. 2005

Heffner JE –Diagnosis and management of malignant pleural effusion. Respiriology. 2008

Hideharu Kimura,^{1,2} Yutaka Fujiwara,³ Takashi Sone,² Hideo Kunitoh,³ Tomohide Tamura,³ Kazuo Kasahara² and Kazuto Nishio^{1,4,5,6}; EGFR mutation status in tumor-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting the response to Gefitinib 2006, ¹Shien-Laboratory, National Cancer Center Hospital, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, ²Respiratory Medicine, Kanazawa, ³Medical Oncology, National Cancer Center Hospital, Tsukiji, ⁴Pharmacology Division and ⁵Center for Medical Genomics, National Cancer Center Research Institute

Jenn-Yu Wu¹, Shang-Gin Wu¹, Chih-Hsin Yang², Chien-Hung Gow⁴, Yih-Leong Chang³, Chong-Jen Yu¹, Jin-Yuan Shih¹ and Pan-Chyr Yang¹

Johnston WW. The malignant pleural effusion: a review of cytopathologic diagnosis of 584 specimens from 472 consecutive patients. Cancer 1985

Judson M.A., Sahn SA: Pulmonary physiologic abnormalities caused by pleural disease. *Semin Respir Crit Care Med* 1995

Kelly K, Crowley J, Bunn PA, Jr, Presant CA, Grevstad PK, Moinpour CM, Ramsey SD, Wozniak AJ, Weiss GR, Moore DF, Israel VK, Livingston RB, Gandara DR. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non--small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial. *J Clin Oncol.* 2001;

Lee YC, Light RW: Management of Malignant Pleural Effusion. (Related articles) *Respirology*

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004

Loddenkemper R. Thoracoscopy – state of the art. *Eur. Respir J* 1998

Lorch DG, Gordon L, Wooten S. Effect of patient positioning on distribution of tetracycline in the pleural space during pleurodesis. *Chest* 1988

Marchetti A. Normanno N. : Raccomandazioni per l'analisi mutazionale del gene EGFR nel carcinoma al polmone AIOM-SIAPEC-IAP 2012

Matthay RA, Copping L, Shaw C, Filderman AE : Malignancies metastatic to the pleura. *Invest Radiol*, 1990

Michaud G., Berkowitz D.M. e Ernst A. Pleuroscopy for diagnosis and therapy for pleural effusion, *Chest.*, Nov., 138(5), 2010

Miserochi G, Venturoli D, Negrini D, et al: Intrapleural fluid movements described by a porous flow model. *J appl Physiol*, 1992

Moghissi K- The Malignant pleural effusion: tissue diagnosis and treatment. *International Trends. In: Deslauriers J, Laquet KL. General Thoracic Surgery vol.6. St. Louis, Missouri : C.V. Mosby Company* 1990

Noppen M. Pleural biopsy and thoracoscopy .In: *Interventional Pulmonology. Strausz J. e Bolliger C.T. Editors. European Respiratory Society Monograph*, 48, 2010

Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*.2004

Pan Q, Pao W and Ladanyi M: Rapid polymerase chain reaction based detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in lung adenocarcinomas .*J MolDiagn* 7:2005

Parkin et al, 2005

Pass HI, Johnson DH, Minna JD, Turrisi AT. Lung cancer principles and practice Clinical Presentation of Non-Small Cell Carcinoma of the Lung 2005. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins

Pirker R et al.*J Thorac Oncol* 2010

PISELLO F., GERACI G., SCIUMÈ C., LI VOLSI F., PLATIA L., FACELLA T., ROMEO M., MODICA G. :Toracentesi e pleurodesi nel trattamento dei versamenti pleurici. *Esperienzapersonale G Chir* Vol. 29 - n. 6/7 - Giugno-Luglio 2008

Prakash UB, Reiman HM. Comparison of needle biopsy with cytologic analysis for the evaluation of pleural effusion: analysis of 414 cases. *Mayo ClinProc* 1985

Rodriguez-Panadero F, Segado A, Juan JM. Failure of talc pleurodesis is associated with increased pleural fibrinolysis. *Am J RespirCrit Care Med* 1995

Sahn SA – State of the art – the pleura.*Am Rev Respir Dis*. 1988

Savic S et al . *British journal of cancer* 2008

Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, Zhu J, Johnson DH., the Eastern Cooperative Oncology Group Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2002

Shaw P, Agarwall R. Pleurodesis for malignant pleural effusions.*Cochrane Database of Systematic Reviews* 2004

Shaw P, Agarwald R. Pleurodesis for malignant pleural effusions.*Cochrane database of Systemic Reviews* 2006

Smits AJ , Kummer JA , Hinrichs JW , Herder GJ , Scheidel-Jacobse KC , Jiwa NM , Ruijter TE , Nooijen PT , Looijen-Salamon MG ,Ligtenberg MJ , Thunnissen FB , Heideman DA , de Weger RA , A Vink .Dipartimento di Patologia, St. Antonius Hospital, Nieuwegein, PaesiBassi. Cella Oncol (Dordr). 2012

Sordella R, Bell DW, Haber DA and Settleman J:Gefitinib sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathway. Science 305,2004

Staub NC, Wiener – KronichJP ,Albertine KH. The Pleural in Health and Disease. Chretien J, Bignon J, Hirsh A (Eds) Marcel Dekker, New York, 1985

Takano et al 2005; Asano et al 2006

Tan C, Sedrakyan A, Browne J, Swift S, Treasure T. The evidence on the effectiveness of management for malignant pleural effusion: a systematic review. Eur J CardiothorSurg 2006

Wu SG , Gow CH , Yu CJ , Chang YL , Yang CH , Hsu YC , Shih JY , Lee YC , PC Yang .Dipartimento di Medicina Interna, National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan.EurRespir J 2008

Xie C, Teixeira LR, McGovern JP. Systemic corticosteroids decrease the effectiveness of talc pleurodesis. Am J RespirCrit Care Med 1999

Yim AP. Port-site recurrence following video-assisted thoracoscopy surgery.SurgEndosc 1995