



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE, ONCOLOGICHE E
GASTROENTEROLOGICHE

Direttore: Ch.mo Prof. Fabio Farinati

UOC ONCOLOGIA 2–ISTITUTO ONCOLOGICO VENETO
I.R.C.C.S.

Direttore: Ch.ma Prof.ssa Valentina Guarneri

TESI DI LAUREA

Ruolo della biopsia liquida nel monitoraggio di pazienti con neoplasia polmonare EGFR mutata: uno studio prospettico

RELATRICE: Prof.ssa Valentina Guarneri

CORRELATORE: Dott.ssa Laura Bonanno

LAUREANDO: Filippo Boccarossa

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	1
1.INTRODUZIONE: CANCRO POLMONARE ...	5
<u>1.1 EPIDEMIOLOGIA</u>	5
<u>1.2 FATTORI DI RISCHIO</u>	6
<u>1.3 PREVENZIONE</u>	7
<u>1.4 PRESENTAZIONE CLINICA</u>	8
<u>1.5 DIAGNOSI E STADIAZIONE</u>	11
1.5.1 Esami di imaging	11
1.5.2 Campionamento biptico	12
1.5.3 Stadiazione	14
<u>1.6 CARATTERIZZAZIONE ISTOLOGICA</u>	19
<u>1.7 PATOLOGIA MOLECOLARE NEL NSCLC</u>	21
<u>1.8 TRATTAMENTO DEL NSCLC</u>	27
1.8.1 NSCLC precoce	27
1.8.2 NSCLC localmente avanzato	29
1.8.3 NSCLC avanzato	30
<u>1.9 BIOPSIA LIQUIDA</u>	35
2. SCOPO DELLO STUDIO	37
3. MATERIALI E METODI	38
<u>3.1 DISEGNO DI STUDIO</u>	38
<u>3.2 OBIETTIVI DELLO STUDIO</u>	38
<u>3.3 CRITERI DI INCLUSIONE ED ESCLUSIONE</u>	39
<u>3.4 RACCOLTA DEI DATI</u>	40
<u>3.5 ANALISI MOLECOLARE</u>	41
<u>3.6 ANALISI STATISTICA</u>	42
4. RISULTATI	44
<u>4.1 CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE</u>	44
<u>4.2 DATI SUL TRATTAMENTO</u>	48
<u>4.3 BIOPSIA LIQUIDA</u>	56
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	60
6. BIBLIOGRAFIA	64

RIASSUNTO

Presupposti dello studio: lo studio REM (CESC IOV 2021-107-PU) è uno studio osservazionale prospettico multicentrico coordinato dall'Istituto Veneto di Oncologia, Padova. Il suo scopo è osservare il profilo molecolare su plasma di pazienti con mutazione sensibilizzante di EGFR al basale e durante il trattamento oncologico di prima linea con osimertinib e la sua correlazione con l'andamento clinico. In questa tesi vengono presentati i risultati preliminari che riguardano il ruolo predittivo della biopsia liquida eseguita precocemente durante il trattamento.

Metodi: pazienti affetti da NSCLC avanzato con mutazione di EGFR candidati a trattamento professionale con osimertinib in prima linea sono stati prospetticamente arruolati. I campioni di plasma sono stati raccolti al momento dell'inizio del trattamento (T0), dopo 10 giorni (T1), dopo 28 giorni (T2) e al momento della progressione radiologica o clinica (T3). Le mutazioni dell'EGFR nel plasma sono state analizzate mediante real-time PCR e ne è stato ricavato un indice semiquantitativo (ISQ). La variazione rispetto al basale nell'ISQ dell'EGFR è stata considerata come differenza dal basale a diversi punti temporali (T0-T1 e T0-T2). La risposta radiologica è stata valutata in base ai Criteri di Valutazione della Risposta nei tumori solidi 1.1.

Risultati: al momento delle analisi effettuate per il lavoro di tesi (Aprile 2023) sono stati reclutati 34 pazienti: prevalentemente femmine (N=24, 70,6%) e non fumatori (N=23, 67,6%); l'età media alla diagnosi era di 70 anni (IQR 67-77). L'istologia prevalente era l'adenocarcinoma (N=32, 94,1%) e la maggior parte dei pazienti presentava una mutazione EGFR comune (brevi delezioni in-frame nell'esone 19: N=18, 52,9%; mutazione puntiforme L858R nell'esone 21: N=12, 35,3%). Il tasso di risposta obiettiva (ORR) all'osimertinib di prima linea è stato 70,6% (95% CI, 52,5-

84,9), mentre i dati sulla sopravvivenza erano immaturi al momento dell'analisi. La concordanza tra i test tissutale e plasmatico al basale è risultata essere del 76,5% (95% CI, 58,9-89,3), quindi l'EGFR ISQ al T0 era disponibile per 26 pazienti. La clearance della mutazione plasmatica dell'EGFR in T2 è stata rilevata in 20 pazienti su 26 (76,9%). È stata riscontrata una correlazione tra la variazione dell'EGFR ISQ e il tasso di risposta: una diminuzione dell'EGFR ISQ al basale (T0-T2) $\geq 50\%$ è stata associata a una maggiore probabilità di raggiungere la risposta al trattamento (OR 13,5, IC 95%, 1,1-165,9, $p=0,042$).

Conclusioni: il monitoraggio della mutazione dell'EGFR basato sul plasma potrebbe essere utilizzato come marker predittivo per la risposta nei pazienti aventi NSCLC con EGFR mutato che ricevono osimertinib in prima linea e utilizzato per personalizzare il trattamento di prima linea.

ABSTRACT

Background: REM trial (CESC IOV 2021-107-PU) is an observational prospective multicenter Italian study coordinated by Veneto Institute of Oncology, Padua. Its aim is to depict plasma molecular profiling of patients with sensitizing EGFR mutation at baseline and during first line treatment with osimertinib and its correlation with clinical outcome. In this thesis preliminary results about the predictive role of liquid biopsy performed early during treatment are presented.

Methods: EGFR-mutated aNSCLC patients receiving first-line osimertinib were prospectively enrolled. Plasma samples were collected at the beginning of the treatment (T0), after 10 (T1) and 28 days (T2) and at the time of radiological or clinical progression (T3). EGFR mutations in plasma were analyzed by real-time PCR and a semiquantitative index (SQI) was derived. Change from baseline in EGFR SQI was considered as difference from baseline to different time-points (T0–T1 and T0–T2). Clinical response was evaluated by Response Evaluation Criteria in Solid Tumors 1.1.

Results: At data cut-off (April 2023), 34 patients were included: mainly females (N=24,70.6%) and never smokers (N=23, 67.6%); median age at diagnosis was 70 years (IQR 67-77). The prevalent histology was adenocarcinoma (N=32, 94.1%) and the majority of pts had a common EGFR mutation (short in-frame deletions in exon 19: N=18, 52.9%; L858R point mutation in exon 21: N=12,35.3%). The objective response rate (ORR) to first-line osimertinib was 70.6% (95% CI, 52.5-84.9), while survival data were immature at time of analysis. The concordance between tissue and plasma testing at baseline was found to be 76.5% (95% CI, 58.9-89.3), so EGFR SQI at T0 was available for 26 pts. Clearance of plasma EGFR mutation at T2 was detected in 20 out of 26 pts (76.9%). A correlation between change in EGFR SQI and response rate was found: a decrease of baseline EGFR SQI (T0-T2) $\geq 50\%$ was associated with increased probability of reaching an objective response (OR 13.5, 95% CI, 1.1- 165.9, $p=0.042$).

Conclusions: Plasma-based EGFR mutation monitoring could be used as a predictive marker for response in EGFR-mutated NSCLC patients receiving first-line osimertinib and therefore to customize first line treatment.

1. INTRODUZIONE:

CANCRO POLMONARE

1.1 EPIDEMIOLOGIA

La neoplasia del polmone si colloca infatti al primo posto per mortalità e al secondo posto per incidenza tra le neoplasie solide nel mondo. Nell'anno 2020 le stime riportano circa 2 milioni di nuovi casi e oltre 1,8 milioni di decessi. Questo significa che nel mondo oltre il 10% delle diagnosi totali di cancro e circa il 20% delle morti sono attribuibili alla neoplasia polmonare. In Italia il tumore polmonare è la seconda neoplasia per incidenza negli uomini (dopo il tumore prostatico) e la terza nelle donne (dopo i tumori mammario e del colon-retto), mentre è al primo posto per mortalità nell'uomo e al secondo nella donna (dopo il tumore mammario)^{1,2}. La neoplasia polmonare insorge generalmente dopo i 40 anni e con l'avanzare dell'età l'incidenza aumenta raggiungendo un apice tra i 65 e gli 85 anni. I dati che abbiamo riguardanti gli USA indicano che l'età media in cui viene fatta diagnosi di tumore del polmone si attesta intorno ai 70 anni e la maggioranza delle diagnosi e dei decessi avviene sopra un'età pari ai 50-55 anni ³.

Nei due sessi si riscontra una differenza importante nell'andamento nel tempo dell'incidenza della neoplasia polmonare. In parte tale differenza è legata al più importante fattore di rischio di questa neoplasia che è rappresentato dal fumo di sigaretta. In particolare, l'abitudine al tabagismo si è modificata negli anni con l'uomo che ha progressivamente diminuito l'abitudine al fumo e la donna che ha invece aumentato tale abitudine. Per cui si è ottenuta progressivamente una convergenza tra la diminuzione dell'incidenza del fumo nel maschio e l'aumento dell'incidenza del fumo nella femmina (nonostante allo stato attuale anche nel sesso femminile si osserva un calo di tale abitudine) e questo è particolarmente rilevante nei Paesi più sviluppati come l'Europa e il Nord America ⁴.

Per quanto riguarda la distribuzione a livello geografico, le neoplasie polmonari presentano un'incidenza e una mortalità maggiori nei paesi industrializzati come

Europa occidentale, Stati Uniti e Asia. L'incidenza nel sesso maschile è maggiore in Asia, Polinesia ed Europa dell'Est, mentre nel sesso femminile è maggiore in Stati Uniti, Europa dell'Ovest e del Sud ⁵.

Nell'anno 2021 in Italia ci sono stati circa 35000 decessi per tumore polmonare con distribuzione maggiore nel sesso maschile rispetto a quello femminile. Considerando la sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi, si rilevano valori compresi tra il 15% e il 24%, con percentuali un po' più alte nella donna rispetto all'uomo.

Vi è una differenza nell'incidenza di questa neoplasia in base alla regione italiana di appartenenza, con valori un po' più elevati in Italia Settentrionale (105 casi su 100000 cittadini) rispetto a quella Meridionale (102 casi su 100000 cittadini) ^{1,6}.

1.2 FATTORI DI RISCHIO

Il fumo di sigaretta risulta essere ad oggi il principale fattore di rischio della neoplasia polmonare ⁷. Nonostante il tabagismo rimanga ancora una problematica centrale per lo sviluppo della neoplasia polmonare e per diverse altre problematiche pneumologiche, oncologiche e cardiovascolari, a partire dall'anno 2019 si è registrata una lieve diminuzione del numero di fumatori nel nostro Paese. Nei giovani il problema risulta essere molto rilevante, con una diffusione del fumo che superava l'11% nel 2018 e con percentuali che potrebbero aumentare negli anni futuri ⁸. L'associazione epidemiologica tra fumo e tumore polmonare si può rilevare nell'80-85% dei casi nell'uomo e nel 50-60% dei casi nella donna. La percentuale di fumatori che poi sviluppano una neoplasia polmonare è pari a circa l'11% con un rischio maggiore di 10-30 volte rispetto ai non fumatori. A livello mondiale si stima che eliminando l'attitudine al fumo si potrebbero prevenire fino al 20% delle morti legate alle neoplasie. Sono stati identificati oltre 50 agenti cancerogeni presenti nel fumo di sigaretta e quelli più rilevanti nello sviluppo del tumore del polmone sembrano essere le nitrosamine specifiche del tabacco (TNSA) che originano dalla nitrosazione della nicotina, processo che si verifica durante la preparazione e la combustione del tabacco.

Un altro problema attuale è dato dall'esposizione a lungo ai fumi inquinanti provenienti da veicoli e industrie, che sono anch'essi associati ad un rilevante

rischio di sviluppo di cancro polmonare ^{9,10}. Le polveri sottili (PM), assieme ad emissioni di combustibili fossili, sono state classificate come cancerogeni di gruppo 1 dall'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC). Si tratta quindi di sostanze per le quali sono stati stabiliti da studi epidemiologici livelli di evidenza sufficienti per poter essere considerate a tutti gli effetti agenti cancerogeni per l'uomo. Un altro fattore di rischio importante è dato dal gas atmosferico inerte derivante dall'uranio, ovvero il radon, la cui esposizione sembra favorire la cancerogenesi ^{11,12}.

Per quanto riguarda le esposizioni occupazionali, ci sono 12 principali agenti occupazionali stabiliti dalla IARC, i quali sembrano essere coinvolti nella cancerogenesi polmonare, tra cui amianto, arsenico, berillio, clorometilene e cadmio ¹³.

Infine è necessario tenere conto delle patologie polmonari implicate nello sviluppo neoplastico, tra cui si trovano la BPCO e la fibrosi polmonare idiopatica. Un dato interessante riguarda l'asma, patologia che secondo alcuni studi sembra aumentare la probabilità di sviluppare neoplasia polmonare, mentre secondo altri tale correlazione non sussiste. ^{14,15}.

1.3 PREVENZIONE

1.3.1 PREVENZIONE PRIMARIA

Per la neoplasia polmonare la prevenzione primaria è data soprattutto dall'astensione dal fumo di sigaretta. Dal momento che il fumo rimane il principale agente coinvolto nell'aumentato rischio di neoplasia polmonare, negli ultimi anni sono state adottate delle misure per ridurre l'esposizione ad esso. Alcuni esempi sono il divieto di fumare nei luoghi pubblici e programmi specifici di educazione alla salute a partire dall'ambiente scolastico ⁸.

1.3.2 PREVENZIONE SECONDARIA

La prevenzione secondaria consiste nel creare gli strumenti necessari affinché la diagnosi venga anticipata in fase precoce (preclinica), quando questo si associa ad

una riduzione di mortalità. Per quanto riguarda le neoplasie polmonari, è stato dimostrato come programmi strutturati di screening tramite TC torace a basso dosaggio in pazienti con elevato rischio di sviluppare neoplasie polmonare (esposizione a fumo di sigaretta) sia uno strumento utile per prevenire una nuova insorgenza di carcinoma polmonare. ^{16,17}.

1.4 PRESENTAZIONE CLINICA

Le manifestazioni cliniche della neoplasia polmonare alla diagnosi possono essere molto variabili. La mancanza di una sintomatologia specifica per questo tumore rappresenta il principale problema per poter fare diagnosi precocemente. Di conseguenza, nella maggior parte dei casi, i pazienti alla diagnosi si trovano già in uno stadio avanzato di malattia. Solamente il 20% dei pazienti risulta del tutto asintomatico al momento della diagnosi, mentre il restante 80% presenta sintomatologia correlabile al tumore e generalmente riconducibile ad uno stadio avanzato di malattia. I sintomi all'esordio possono essere: riconducibili all'estensione locale della malattia, al coinvolgimento di specifiche sedi metastatiche, sintomi costituzionali quali calo ponderale, febbre e astenia oppure relati alla presenza di sindromi paraneoplastiche ^{17,18}. Nella tabella sottostante sono riportati i sintomi più caratteristici del tumore polmonare alla diagnosi con le relative percentuali ¹⁸.

Sintomi e segni	Frequenza (%)
Tosse	45,5
Calo ponderale	34
Dispnea	31,5
Dolore toracico	35
Emottisi	20
Dolore osseo	15
Ippocratismo digitale	10
Febbre	10
Astenia	5
Sindrome cavale superiore	2
Disfagia	1
Stridore e asma	1

Tabella I. Sintomi e segni caratteristici della neoplasia polmonare alla diagnosi, con relativa frequenza ¹⁸.

L'espansione tumorale a livello centrale o endo-bronchiale si può manifestare con sintomi e segni respiratori, quali tosse, dispnea, emottisi, rumori polmonari patologici e processi infettivi ostruttivi. In particolare la rilevazione di sangue nell'espettorato rappresenta un importante campanello d'allarme, avendo una correlazione stretta con il carcinoma polmonare. In caso di tumore che cresce all'interno di un bronco, si può verificare un'ostruzione bronchiale che favorisce l'instaurarsi di processi infettivi ricorrenti a causa della stasi del muco. In presenza di crescita tumorale a livello periferico invece è possibile che si manifestino dispnea, dovuta a patologia restrittiva, oppure dolore toracico, in seguito al coinvolgimento del foglietto pleurico o della parete toracica ^{19,20}. Per quanto riguarda la diffusione intratoracica, possiamo avere sintomi legati alla compressione di organi toracici e strutture mediastiniche in seguito all'aumento dimensionale del tumore. Tra le principali strutture coinvolte in questo processo di espansione e infiltrazione tumorale vi sono: pleura, esofago, parete toracica, trachea, nervi e vasi. Ci sono infine delle vere e proprie sindromi correlate alla compressione di determinate strutture da parte della neoplasia: la sindrome della vena cava superiore, in cui sono presenti turgore giugulare, edema a mantellina, cefalea, capogiri e gonfiore ²¹, la sindrome di Claude-Bernard-Horner, causata dal coinvolgimento del ganglio cervicale inferiore del sistema ortosimpatico e caratterizzata da miosi, ptosi e anidrosi omolaterale ²², e la sindrome di Pancoast,

che si verifica in caso di tumore polmonare apicale con interessamento del plesso brachiale (in questo caso quindi il paziente può presentare dolore e debolezza alla spalla e all'arto superiore, al collo e alla regione superiore del dorso) ²³.

Oltre il 30% dei pazienti con neoplasia polmonare manifesta sintomi legati a localizzazione metastatica di malattia. Le principali sedi di metastasi sono il SNC, l'osso, il fegato, il polmone controlaterale, la pleura, i linfonodi distanti e le ghiandole surrenali ^{18,20}. In presenza di metastasi a livello del SNC si hanno più frequentemente manifestazioni legate all'aumento della pressione intracranica, quali vomito, nausea, vertigini, cefalea generalizzata, acufeni e convulsioni ^{24,25}. L'interessamento osseo può portare a sintomi quali algie di varia intensità e fratture patologiche. Il coinvolgimento pleurico invece solitamente risulta nella formazione di versamento a livello del cavo pleurico. Solitamente la funzione epatica è conservata anche in presenza di metastasi a questo livello, con rari casi di ipertransaminasemia. Per le ghiandole surrenali il discorso è analogo considerando il fatto che la maggior parte dei pazienti con metastasi surrenaliche risulta asintomatica ^{18,20}.

Infine circa il 10% dei pazienti con diagnosi di carcinoma polmonare presenta sindromi paraneoplastiche, ovvero quadri patologici non correlati al tumore primario o a localizzazioni secondarie, che talvolta possono essere presenti anche prima di effettuare la diagnosi di neoplasia. Il loro riconoscimento può quindi aiutare nella diagnosi precoce, da qui l'importanza nel riconoscerle quando presenti. Si tratta di sindromi che si verificano in pazienti con tumore soprattutto a piccole cellule e che sono legate alla liberazione di una serie di sostanze ad attività endocrina da parte delle cellule tumorali. ²⁶. Le più rilevanti sindromi paraneoplastiche dal punto di vista clinico sono: la sindrome da inappropriata secrezione di ADH (SIADH) che è causata generalmente da produzione ectopica di ormone antidiuretico ²⁰, la sindrome di Cushing che è dovuta solitamente all'eccessiva secrezione di ACTH (più raramente di CRH) ²⁷, l'ipercalcemia maligna con alla base un'aumentata produzione di peptide correlato al PTH o di metabolita attivo della vitamina D ^{28,29}, la sindrome da carcinoide che è caratterizzata dal

rilascio eccessivo di serotonina ³⁰, ma anche sindromi connettivo-scheletriche, sindromi neurologiche, sindromi ematologiche, sindromi cutanee e renali ²⁰.

1.5 DIAGNOSI E STADIAZIONE

L'inquadramento diagnostico della neoplasia polmonare prevede non solo la diagnosi vera e propria della patologia, ma anche la stadiazione e la caratterizzazione molecolare della malattia, tutti fattori in grado di influenzare quelle che saranno le strategie terapeutiche da adottare. Innanzitutto bisogna raccogliere in maniera accurata l'anamnesi (età, familiarità, tabagismo, allergie) e le informazioni riguardanti il quadro clinico del paziente (performance status, patologie pregresse, comorbidità, interventi precedenti). Per la diagnosi di neoplasie è sempre necessario l'approccio bioptico, grazie al quale è possibile avere informazioni che riguardano l'origine della neoplasia e spesso fattori biologici che influenzano andamento clinico e scelte terapeutiche ⁶. La stadiazione mediante esami strumentali permette invece di comprendere l'eventuale diffusione a livello locale e sistemico ¹⁷.

1.5.1 ESAMI DI IMAGING

Nei pazienti che non presentano sintomatologia, la radiografia del torace può consentire di riconoscere la presenza di lesioni polmonari sospette, mentre nei soggetti che presentano sintomatologia legata al tumore primitivo, spesso rappresenta la prima indagine strumentale utilizzata ^{18,31}. Dopo aver formulato un'ipotesi diagnostica sulla base dell'esame radiografico, è necessario approfondire il quadro con una TC del torace con mezzo di contrasto, tecnica di imaging fondamentale per la diagnosi e la stadiazione della neoplasia. La TC con MdC rappresenta ad oggi la principale metodica per la rilevazione di noduli e masse polmonari, consentendo di identificare la localizzazione e l'estensione della lesione. Infatti quest'esame strumentale permette non solo di individuare masse sospette, ma fornisce anche informazioni dettagliate sulle dimensioni della massa,

l'interessamento linfonodale e la presenza di eventuali sedi metastatiche. In particolare alcuni esempi di lesioni tipicamente riscontrate alla TAC con MdC sono: nodulo solitario alla periferia del parenchima polmonare, lesione addensante in sede peri-ilare, addensamento a vetro smerigliato (tipico dell'adenocarcinoma polmonare), atelettasia polmonare, versamento pleurico, adenopatie mediastiniche³¹. Oltre al torace, è necessario estendere tale tecnica anche all'addome superiore e al collo in modo da poter individuare l'eventuale presenza di sedi metastatiche a questo livello. In caso di malattia avanzata, anche quando non è presente una chiara sintomatologia neurologica, può essere indicata una TC encefalica per escludere la presenza di metastasi cerebrali³². Oltre alle metodiche di radiologia convenzionale, anche le metodiche di medicina nucleare, ed in particolare la F-FDG PET viene comunemente utilizzata nell'inquadramento di pazienti con neoplasia polmonare. La F-FDG PET-TC consente di completare la stadiazione della neoplasia qualora la TC non riveli la presenza di metastasi a distanza. Presentando un elevato valore predittivo negativo, ha un'utilità importante nella valutazione linfonodale: se i linfonodi mediastinici risultano negativi in pazienti con patologia localizzata, può non essere necessario procedere con campionamenti bioptici, in caso contrario si procede con accertamenti istologici. Infine è importante sottolineare che questa tecnica ha una sensibilità più alta della TC nell'individuazione delle masse a livello extratoracico ed osseo^{33,34}. La RMN con MdC rappresenta l'esame principale per approfondire l'interessamento del sistema nervoso centrale, particolarmente utile quando sono presenti sintomi neurologici, lesioni dubbie alla TC o neoplasie non localizzate per cui è prevista una terapia a scopo curativo. È una metodica di imaging importante anche perché, in presenza di dubbi alla TC, consente di identificare l'invasione tumorale a livello osseo ed epatico³¹.

1.5.2 CAMPIONAMENTO BIOPTICO

Di fronte ad un sospetto radiologico di neoplasia, la biopsia tissutale risulta indispensabile per la diagnosi e la successiva strategia terapeutica. Il prelievo può

essere fatto a livello del tumore primitivo, delle stazioni linfonodali o delle sedi metastatiche, cercando di ottenere più tessuto con la minor invasività possibile. La diagnosi di neoplasie polmonare può essere ottenuta a partire da un campione citologico o istologico. Tuttavia il campione istologico è, se possibile, sempre da preferire perché consente di ottenere informazioni sulla presenza di marcatori molecolari che possono indirizzare verso una terapia target specifica ^{35,36}.

Il campionamento bioptico può essere svolto in diversi modi. Le procedure più utilizzate per ottenere il campione istologico sono broncoscopia e biopsia percutanea. L'approccio tramite broncoscopia è la tecnica di scelta in caso di tumore a sede centrale o in presenza di adenopatie mediastiniche in prossimità dei bronchi. La broncoscopia consente di svolgere varie tipologie di campionamento, quali lo spazzolamento, il lavaggio bronchiale e le biopsie bronchiali e trans-bronchiali. La biopsia trans-bronchiale mediante EBUS-TBNA prevede l'esecuzione di una broncoscopia con supporto ecografico che permette di guidare la perforazione del bronco e la successiva biopsia della lesione. Tramite l'EBUS-TBNA è possibile non solo eseguire un accurato campionamento tissutale, ma anche valutare ecograficamente i linfonodi loco regionali. Questi ultimi possono essere biopsiati in modo da ottenere informazioni fondamentali sul parametro N del sistema di stadiazione TNM. Nei pazienti sottoposti a broncoscopia in sospetta neoplasia del polmone, questa metodica consente la diagnosi in circa il 70-80% dei casi ³⁷. La biopsia percutanea TAC guidata viene invece principalmente utilizzata in caso di tumore a localizzazione periferica, a cui si può accedere dall'esterno senza il rischio di un'eventuale compromissione degli organi interni. Presenta un'accuratezza diagnostica pari al 95% per lesioni superiori a 2 cm, nonostante abbia un rischio piuttosto alto di pneumotorace (10-30%). Sono possibili anche altri rischi legati alla procedura, quali emorragia ed embolia gassosa ^{38,39}. Biopsie sotto guida TC o ecografica possono essere eseguite anche a livello di sedi metastatiche come per il campionamento di lesioni linfonodali o epatiche. In alcuni casi si rendono necessarie procedure diagnostiche chirurgiche quali la mediastinoscopia, in presenza di adenopatie mediastiniche di difficile accesso endoscopico, oppure la toracoscopia con biopsia, prevalentemente in caso di coinvolgimento pleurico ⁴⁰.

1.5.3 STADIAZIONE

L'iter diagnostico deve essere completato con la stadiazione della neoplasia polmonare, che fornisce informazioni fondamentali per definire lo stato di avanzamento della patologia tumorale e quindi per valutare la prognosi del paziente. Attualmente in clinica si utilizza l'VIII edizione del sistema TNM, che si basa su tre diversi parametri: T, ovvero l'estensione anatomica del tumore primitivo, N che rappresenta l'interessamento linfonodale e M che valuta eventuali metastasi a distanza. È possibile inoltre differenziare due tipi di stadiazione: quella clinica, che utilizza informazioni provenienti da esame obiettivo, esami ematochimici, esami di imaging, procedure endoscopiche e biotiche, e quella patologica, che utilizza informazioni provenienti dall'analisi anatomopatologica del pezzo operatorio. Dalla combinazione dei tre parametri precedentemente elencati si ottiene lo staging di malattia, che va dallo stadio iniziale I-II a quello localmente avanzato III fino allo stadio avanzato IV, con prognosi che peggiora all'aumentare dello stadio ^{6,12}.

	N0	N1	N2	N3
T1	IA	IIB	IIIA	IIIB
T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1a	IVA	IVA	IVA	IVA
M1b	IVA	IVA	IVA	IVA
M1c	IVB	IVB	IVB	IVB

Tabella II. Gruppi di stadiazione secondo la classificazione TNM, VIII edizione ⁶.

Il fattore T si basa sulle dimensioni della massa tumorale e sui rapporti che essa contrae con le strutture circostanti. Determina l'estensione del tumore primitivo a livello locale. Tiene conto anche dell'interessamento di parete toracica, pleura,

bronchi e altre strutture mediastiniche. In presenza di questi coinvolgimenti, aumenta il valore di questo parametro con conseguente peggioramento della prognosi. Inoltre dinnanzi a più noduli polmonari nello stesso lobo o in lobi diversi dello stesso polmone, ci troviamo rispettivamente in presenza di un T3 e di un T4

6.

Tx	Evidenza istopatologica di tumore (cellule maligne nelle secrezioni o nel lavaggio bronchioalveolare) ma non valutabile o dimostrabile radiologicamente od in broncoscopia.	
T0	Nessuna evidenza di tumore primitivo	
Tis	<ul style="list-style-type: none"> ○ Carcinoma squamoso in situ ○ Adenocarcinoma in situ (pattern lepidico con dimensioni $\leq 3\text{cm}$) 	
T1	<ul style="list-style-type: none"> ○ Dimensioni: $\leq 3\text{cm}$ ○ Vie aeree: posizione distale rispetto ai bronchi lobari ○ Invasione locale: nessuna (circondato da polmone o pleura viscerale) 	
	T1mi	○ Adenocarcinoma minimamente invasivo (pattern lepidico, con dimensioni $\leq 3\text{cm}$ ed infiltrazione $\leq 5\text{mm}$)
	T1a	○ Dimensioni $\leq 1\text{cm}$
	T1b	○ Dimensioni 1-2cm
	T1c	○ Dimensioni 2-3cm
T2	<ul style="list-style-type: none"> ○ Dimensioni 3-5cm ○ Vie aeree: invasione dei bronchi principali o presenza di atelettasia o di ostruzione ○ Invasione locale: pleura viscerale (PL1 o PL2) ○ Polmonite che si estende fino alla regione ilare 	
	T2a	○ Dimensioni: 3-4cm
	T2b	○ Dimensioni: 4-5cm
T3	<ul style="list-style-type: none"> ○ Dimensioni: 5-7 cm ○ Invasione locale: parete toracica, pleura parietale (PL3), nervo frenico, o pericardio parietale. ○ Noduli tumorali separati nel medesimo lobo del tumore primitivo 	
T4	<ul style="list-style-type: none"> ○ Dimensioni: $>7\text{cm}$ ○ Vie aeree: invasione della carena o della trachea ○ Invasione locale: diaframma, mediastino, cuore, grandi vasi, nervo laringeo ricorrente, esofago o corpi vertebrali. ○ Noduli tumorali separati in lobi ipsilaterali differenti dal tumore primitivo 	

Tabella III. Fattore T secondo la stadiazione TNM per carcinoma polmonare, VIII edizione ⁴⁰.

Il parametro N si basa sull'interessamento dei linfonodi loco regionali (peribronchiali, ilari, intrapolmonari, sottocarenali, paraaortici, mediastinici, sopraclaveari). Nella figura 1 è presente la classificazione dei linfonodi secondo l'International Association for the Lung Cancer (IASLC) ^{6,41}.

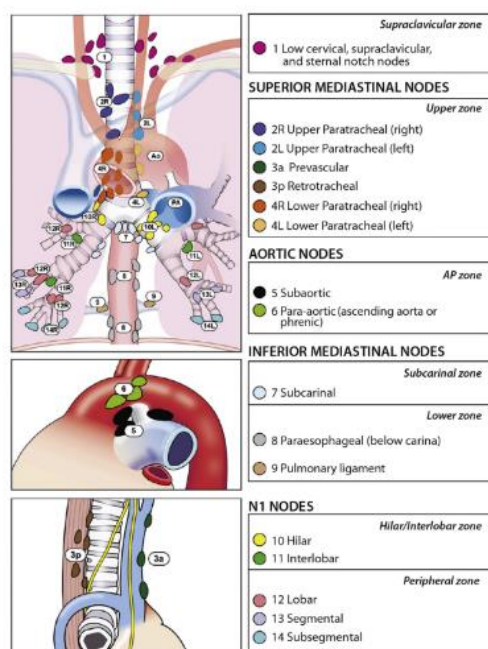


Figura 1. Classificazione dei linfonodi secondo la IASLC ⁴¹.

A seconda dei linfonodi interessati da metastasi, il parametro N assume valori che comprendono: N0 (assenza di metastasi regionali), N1 (metastasi nei linfonodi peribronchiali e/o ilari ipsilaterali e intrapolmonari), N2 (metastasi nei linfonodi mediastinici e/o sottocarenali) e N3 (metastasi mediastiniche o ilari controlaterali, scaleni o sovraclaveari ipsilaterali o controlaterali) ⁶.

N – LINFONODI LOCO-REGIONALI	
NX	I linfonodi regionali non possono essere valutati
N0	Assenza di metastasi nei linfonodi regionali
N1	Metastasi nei linfonodi peribronchiali e/o ilari ipsilaterali e intrapolmonari, incluso il coinvolgimento per estensione diretta
N2	Metastasi nei linfonodi mediastinici e/o sottocarenali ipsilaterali
N3	Metastasi nei linfonodi mediastinici controlaterali, ilari controlaterali, scaleni o sovraclaveari ipsi- o contro-laterali

Tabella IV. Fattore N secondo la stadiazione TNM, VIII edizione ⁶.

Il fattore M indica la presenza o l'assenza di metastasi a distanza, le quali possono essere rilevate tramite esami di imaging e, in caso di dubbio, la conferma si ha con l'esame istologico ⁴². Le più frequenti sedi metastatiche del tumore polmonare

sono rappresentate da SNC (39%), ossa (34%), fegato (20%), polmone (18%), pleura (10%) e ghiandole surrenali (8%) ⁴³. Le principali metodiche di imaging che consentono di valutare la presenza o meno di metastasi sono:

-TC del torace con MdC, che rappresenta la tecnica principale per la stadiazione e per il monitoraggio della terapia;

-PET, particolarmente sensibile per valutare interessamento linfonodale, interessamento osseo e altre metastasi a distanza, ma non molto sensibile per lesioni di esigue dimensioni o situate in prossimità di zone ipercaptanti ⁴⁴;

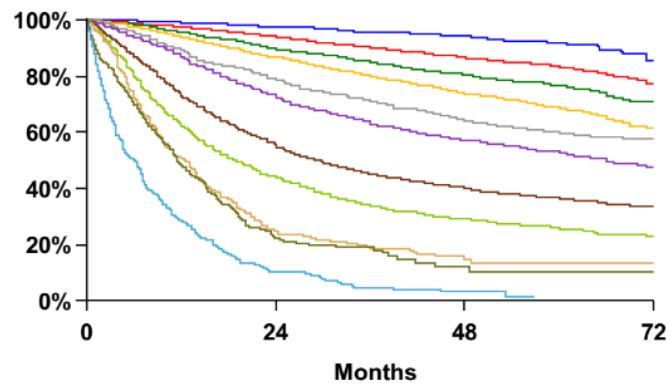
-RMN, che può integrare la valutazione operata dalle due metodiche precedentemente nominate e rappresenta il gold standard per valutare la presenza di metastasi cerebrali ⁴⁵.

M – METASTASI A DISTANZA	
M0	Assenza di metastasi a distanza
M1a	Noduli tumorali in un lobo controlaterale rispetto al tumore primitivo; tumore con noduli pleurici/pericardici o versamento neoplastico pleurico o pericardico
M1b	Singola metastasi extratoracica
M1c	Multiple metastasi extratoraciche in uno o più organi

Tabella V. Fattore M secondo la stadiazione TNM, VIII edizione ⁶.

Lo stadio TNM di malattia rappresenta quindi il fattore di maggiore rilevanza nella valutazione prognostica del paziente. Questo è dimostrato dal fatto che la sopravvivenza a 5 anni è pari al 90% circa in caso di stadio IA, mentre scende al di sotto del 10% in caso di stadio IV ⁶. Dal momento che spesso la neoplasia polmonare viene diagnosticata in fase avanzata di malattia (stadio III-IV), la prognosi è spesso infausta: in Italia i pazienti sopravvissuti a 5 anni dalla diagnosi non superano in genere il 15-20% dei casi. Dinnanzi ad una malattia metastatica, oltre ai parametri che definiscono il TNM, assumono una rilevanza anche età, sesso, tabagismo, interventi pregressi, comorbidità presenti e performance status. Inoltre, nell'outcome dei pazienti con neoplasia avanzata, hanno un peso

importante tutte quelle alterazioni molecolari che possono essere oggetto di terapie specifiche, quali mutazioni di EGFR, riarrangiamenti di ALK o ROS1, mutazioni di MET o RET. La terapia molecolare ha avuto un grande impatto in questi ultimi anni dimostrandosi in grado di migliorare notevolmente la prognosi di pazienti in stadio avanzato⁶⁴⁶.



Proposed	Events / N	MST	24 Month	60 Month
IA1	68 / 781	NR	97%	92%
IA2	505 / 3105	NR	94%	83%
IA3	546 / 2417	NR	90%	77%
IB	560 / 1928	NR	87%	68%
IIA	215 / 585	NR	79%	60%
IIB	605 / 1453	66.0	72%	53%
IIIA	2052 / 3200	29.3	55%	36%
IIIB	1551 / 2140	19.0	44%	26%
IIIC	831 / 986	12.6	24%	13%
IVA	336 / 484	11.5	23%	10%
IVB	328 / 398	6.0	10%	0%

Figura 2. Sopravvivenza fino a 72 mesi e sopravvivenza a 24 e 60 mesi in pazienti con NSCLC suddivisi in base allo stadio TNM (VIII edizione)⁴⁷.

1.6 CARATTERIZZAZIONE ISTOLOGICA

Nella scelta della strategia terapeutica un peso sostanziale è dato dalla caratterizzazione istologica del tumore polmonare. In base ai criteri morfologici è possibile suddividere i carcinomi polmonari in due grandi gruppi: il tumore non a piccole cellule (NSCLC, non small cell lung cancer) che rappresenta circa l'80% dei casi, e il tumore a piccole cellule (SCLC, small cell lung cancer) che rappresenta il restante 15% dei casi ⁶.

1.6.1 CARCINOMA NON A PICCOLE CELLULE (NSCLC)

I carcinomi non a piccole cellule rappresentano oltre l'85% dei carcinomi polmonari. I tre istotipi principali sono: l'adenocarcinoma, il carcinoma squamocellulare e quello a grandi cellule. La definizione degli istotipi avviene all'analisi microscopica, sulla base di criteri morfologici e di specifici marcatori immunohistochimici.

ADENOCARCINOMA

Attualmente è al primo posto in termini di frequenza, rappresentando più del 40% dei casi di carcinoma polmonare. È maggiormente diffuso tra i non fumatori con predilezione per il sesso femminile. La sua incidenza aumenta nei paesi sviluppati e l'eziologia sembra essere correlata a fattori genetici e ambientali ^{6,31}. Si tratta di un tumore che a livello polmonare insorge più frequentemente in periferia, dove può invadere la pleura con conseguente versamento pleurico, e può metastatizzare per via sistemica. Origina dall'epitelio della superficie o delle ghiandole bronchiali con cellule epiteliali a differenziazione ghiandolare e produttori mucine. All'immunohistochimica l'adenocarcinoma risulta positivo al TTF-1 e alla Napsina A ⁶. Questo istotipo tumorale è quello in cui più frequentemente vengono riscontrate alterazioni associate al concetto di "oncogene-addiction", ovvero caratterizzato da alterazioni molecolari che guidano la crescita tumorale e possono essere trattate in maniera mirata con

farmaci biologici definiti a bersaglio molecolare, quali mutazioni di KRAS e BRAF, mutazioni degli esoni 19 e 20 di EGFR, traslocazioni di ALK ^{46,48}.

CARCINOMA SQUAMO-CELLULARE

Costituisce circa il 20-25% dei casi di carcinoma polmonare, si ritrova maggiormente nei fumatori importanti e ha una predilezione per il sesso maschile. Tipicamente origina dall'epitelio bronchiale con formazione di metaplasia squamosa, la quale può evolvere poi a carcinoma. Si localizza più spesso nelle vie aeree maggiori, dove può invadere la membrana basale e crescere all'interno del lume bronchiale manifestandosi a livello clinico con ostruzione dei bronchi ed atelettasie. Si possono avere forme più differenziate in cui si riconoscono chiaramente la cheratinizzazione e i ponti cellulari, e forme meno differenziate difficilmente distinguibili dal carcinoma a grandi cellule e dal carcinoma a piccole cellule. All'immunoistochimica si riscontra positività per p40 e p60 ^{6,31}.

ALTRE ISTOLOGIE

Il carcinoma polmonare a grandi cellule è un istotipo più raro e rappresenta una diagnosi di esclusione rispetto alle forme maggiormente definite (adenocarcinoma e squamoso). Generalmente rappresenta una forma poco differenziata e può presentare caratteristiche tipiche delle neoplasie neuroendocrine ⁴⁹. Istotipi più rari sono rappresentati da: carcinoma adenosquamoso, che a livello morfologico presenta una componente tipica dell'adenocarcinoma e un'altra tipica del carcinoma squamoso, carcinoma sarcomatoide, che può essere pleomorfo, a cellule giganti, a cellule fusate, sarcoma o blastoma e carcinomi mucoepidermoide, adenoido-cistico e mio-epiteliale ⁶.

1.6.2 CARCINOMA A PICCOLE CELLULE (SCLC)

Il 15% circa dei carcinomi polmonari è rappresentato dagli SCLC, che all'istologia appaiono come masse caratterizzate da cellule piccole con nucleo grande e poco citoplasma che si dividono molto velocemente. Si tratta di un tumore fortemente associato al fumo di sigaretta e la cui incidenza sembra in calo. I marcatori

immunoistochimici tipici sono quelli dei tumori neuroendocrini, di cui lo SCLC fa parte, quali cromogranina A e sinaptofisina. Sono carcinomi molto aggressivi, con rapida crescita e dotati di un grande potere invasivo, tanto che sono diagnosticati spesso in fase già metastatica e la prognosi è infausta ⁵⁰⁻⁵².

1.7 PATOLOGIA MOLECOLARE NEL NSCLC

Individuare alterazioni molecolari alla base dello sviluppo delle neoplasie polmonari consente di intraprendere terapie mirate nei pazienti portatori di tali mutazioni. Secondo le linee guida, in caso di neoplasie di stadio avanzato, la diagnosi istologica deve essere completata con la caratterizzazione molecolare, andando a ricercare le principali mutazioni "driver", ovvero responsabili della carcinogenesi e trattabili con inibitori specifici. Per cui, nei pazienti con NSCLC avanzato, la valutazione di questi marcatori molecolari è fondamentale per attuare una strategia terapeutica mirata, in grado talvolta di aumentare di molto l'aspettativa di vita. Vengono detti "oncogene-addicted", i tumori la cui crescita è guidata da mutazioni o traslocazioni genetiche, le quali sono nella maggior parte dei casi mutuamente esclusive le une con le altre. Sono tipicamente associate all'adenocarcinoma ed insorgono generalmente nei pazienti non fumatori e di età più giovane. Queste alterazioni molecolari possono essere ricercate con diverse metodiche:

- Reazione a catena della polimerasi (PCR): consente di amplificare una determinata sequenza di materiale genetico tramite l'aggiunta di vari reagenti ed enzimi e attraverso vari processi di termoregolazione. La variante RT-PCR, che allo stesso tempo permette di amplificare e quantificare la sequenza di interesse, rappresenta attualmente il gold standard per analizzare piccole delezioni, inserzioni o mutazioni del DNA ⁵³;
- ibridazione in situ fluorescente (FISH): utilizza sonde fluorescenti in grado di legarsi a sequenze specifiche sia di DNA che di RNA. Può essere eseguita sia su

prelievi solidi che liquidi e riveste un ruolo primario per la conferma della presenza di specifici riarrangiamenti come quelli di ALK e ROS1 ⁵⁴;

-Immunohistochimica (IHC): usa anticorpi monoclonali coniugati con un enzima o un fluorocromo che riconoscono marker proteici sulle cellule neoplastiche rendendole visibili. Si tratta di una metodica che consente la diagnosi differenziale tra tumore polmonare e tumori differenti, la distinzione tra i vari istotipi polmonari e la valutazione dei livelli di PD-L1. È semplice da eseguire ed è a basso costo, utilizzabile anche in caso di materiale esiguo;

-Next generation sequencing (NGS): si basa sul sequenziamento in parallelo di multiple sequenze di DNA, o RNA rilevando in un'unica seduta le principali alterazioni molecolari d'interesse in diversi geni. È possibile che tali analisi vengano eseguite sequenziando tratti specifici di DNA (generalmente per la ricerca di alterazioni genetiche particolari) oppure l'intero genoma (metodica questa non utilizzata in pratica clinica ma solo a scopo di ricerca) ^{55,56};

1.7.1 ALTERAZIONI MOLECOLARI RICERCATE NELLA PRATICA CLINICA

Le linee guida italiane ed europee indicano che in tutti i pazienti con neoplasia NSCLC in fase avanzata ad istologia non squamosa e nei pazienti con istologia squamosa in presenza di alcune caratteristiche cliniche quali l'assente o ridotta esposizione al fumo di sigaretta, devono essere eseguite le indagini molecolari atte a determinare:

-la presenza di mutazioni sensibilizzanti di EGFR e di mutazione V600 di BRAF, di riarrangiamenti di ALK e ROS1, necessari per la scelta terapeutica di prima linea.

-la presenza di mutazioni exon skipping esone 14 di MET, fusioni di RET, mutazione G12C di KRAS, riarrangiamenti di NTRK (e se possibile inserzione esone 20 di HER2); tali alterazioni non sono necessarie per la scelta terapeutica di prima linea ma sono da ricercarsi comunque appena possibile ^{6,57}.

Inoltre in tutti i pazienti deve essere eseguita la determinazione IHC di PD-L1, che può essere espresso sulla superficie delle cellule tumorali. Il legame tra PD-L1

casi è dato dalla delezione dell'esone 19 o dalla sostituzione L858R dell'esone 21⁵⁹. Si tratta delle mutazioni più comuni e che si associano a maggior sensibilità agli inibitori tirosinchinasici (TKI) di EGFR. La mutazione T790M che coinvolge l'esone 20 rappresenta il principale meccanismo di resistenza acquisita nei confronti della terapia con TKI di prima e seconda generazione e conferisce sensibilità al trattamento con osimertinib in seconda linea⁶⁰.

ALK è un recettore tirosin-chinasico la cui funzione non è ancora del tutto chiara ed è codificato dal gene della chinasi del linfoma anaplastico, che si trova sul cromosoma 2. Il gene si trova riarrangiato soprattutto in pazienti giovani, di sesso femminile, poco o non fumatori e con diagnosi di adenocarcinoma, carcinoma a grandi cellule o misto. Tra i diversi riarrangiamenti possibili, il più frequente è quello con il gene EML4 dando origine al gene di fusione ALK-EML4. Quest'ultimo codifica per una proteina transmembrana ad attività tirosin-chinasica costitutiva con conseguente stimolazione della proliferazione cellulare. I riarrangiamenti di ALK possono essere ricercati mediante FISH, real-time PCR, NGS e IHC.

In presenza di riarrangiamenti di ALK si utilizzano in prima linea inibitori tirosin-chinasici di ALK⁶.

ROS-1 è un recettore tirosin-chinasico che presenta una struttura simile ad ALK e che è codificato dal gene ROS1 presente nel cromosoma 6. Tuttavia il ligando che si lega al sito di reclutamento per l'attivazione del recettore rimane sconosciuto. Anche ROS-1 come ALK, può andare incontro a riarrangiamenti che determinano un'attivazione costitutiva del dominio tirosin-chinasico, con stimolazione di cascate di segnale che portano ad una proliferazione cellulare incontrollata. Il riarrangiamento più frequente e studiato è la fusione con il gene CD74, dando origine al gene di fusione CD74-ROS1. La formazione di quest'ultimo sembra poi determinare l'attivazione di meccanismi che portano alla fosforilazione della proteina E-SyT-1, in grado di conferire alla cellula tumorale capacità metastatica. Riarrangiamenti di ROS1 si ritrovano nel 1-2,5% degli adenocarcinomi e soprattutto in pazienti non fumatori e sotto i 50 anni^{61,62}.

BRAF è un gene che codifica per una chinasi che appartiene alla famiglia delle Raf chinasi, implicate in vie di trasmissione del segnale che regolano crescita e sopravvivenza delle cellule. In presenza di mutazioni a carico di questa proteina, si

verifica l'attivazione costitutiva della cascata delle MAPK, risultando in una proliferazione cellulare eccessiva. Circa l'1,5-4% dei pazienti con NSCLC presenta BRAF mutato, con frequenza maggiore nei pazienti fumatori con diagnosi di adenocarcinoma⁶³. La mutazione più frequente di BRAF è la V600E, in presenza della quale è indicato il trattamento con dabrafenib, inibitore di BRAF, in associazione con trametinib, inibitore di MEK.

I riarrangiamenti di NTRK sono molto rari (<1%) ma devono essere ricercati perché esistono due inibitori specifici di dimostrata efficacia disponibili nella pratica clinica⁶⁴.

MET è un proto-oncogene che codifica per il recettore del fattore di crescita degli epatociti ed è localizzato nel cromosoma 7. Quando il ligando interagisce con MET, si attiva una via di trasduzione del segnale che favorisce la sopravvivenza cellulare. In caso di mutazioni a carico di tale recettore, in particolare lo skipping dell'esone 14, si verifica un'attivazione costitutiva di tale proto-oncogene con conseguente proliferazione cellulare. Due inibitori tirosinchinasici selettivi (tepotinib e capmatinib) hanno dimostrato efficacia in pazienti con mutazione exon skipping di MET e sono indicati in pazienti pretrattati con immunoterapia e/o chemioterapia a base di platino.^{65,66}

KRAS è un proto-oncogene situato nel braccio corto del cromosoma 12 e codifica per una GTPasi (guanosina trifosfatasi) coinvolta in vie di segnalazione che regolano la proliferazione cellulare, come ad esempio RAF-MEK-ERK e PI3K-AKT-mTOR. KRAS mutato si riscontra in oltre il 30% dei casi di NSCLC e le mutazioni più frequenti sono quelle a carico dei codoni 12 e 13, con alterazione dell'attività intrinseca della GTPasi e conseguente deregolazione della proliferazione cellulare. Nel NSCLC le mutazioni di KRAS si ritrovano maggiormente nei caucasici e nei fumatori. L'impatto prognostico di tali mutazioni non è stato ancora ben definito. Numerosi studi hanno evidenziato una prognosi peggiore nei pazienti con la mutazione, anche in virtù della mancata risposta agli inibitori tirosin-chinasici di EGFR (che si trova a monte rispetto a KRAS), mentre altri studi non hanno riscontrato differenze sulla sopravvivenza legate alla presenza della mutazione^{58,66}. La ricerca della mutazione G12C di KRAS è raccomandata poiché esistono due inibitori selettivi

indicati in pazienti in progressione a immunoterapia e/o chemioterapia a base di platino (sotorasib e agrasib).

RET è un proto-oncogene che codifica per un recettore di membrana tirosin-chinasico e le sue fusioni sono driver oncogeni nell'1-2% dei NSCLC. In presenza di tali mutazioni sono stati approvati nella pratica clinica due inibitori di RET dopo progressione a immunoterapia e/o chemioterapia a base di platino: selpercatinib e pralsetinib.

HER2 codifica per una proteina RTK appartenente alla famiglia ERBB e si trova nel braccio lungo del cromosoma 17. Non è noto il suo ligando, ma sappiamo che, una volta attivato, è in grado di modulare la segnalazione EGFR mediata combinandosi con un'altra proteina della famiglia ERBB. In questo modo si verifica l'accensione di cascate di segnale implicate nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare, quali MAPK, PI3K-AKT e JAK-STAT. Nel NSCLC le mutazioni a carico di HER2 si riscontrano maggiormente negli asiatici, non fumatori e di sesso femminile. La mutazione più frequente è l'inserzione dell'esone 20 analogamente a EGFR. L'impatto prognostico di tali alterazioni molecolari non è ancora chiaro, con studi discordanti a riguardo, esistono dati limitati sulla possibile efficacia di inibitori di HER2, tra i quali trastuzumab deruxtecan sembra essere il più promettente, ma non esistono attualmente terapie mirate disponibile per la pratica clinica ⁶.

1.8 TRATTAMENTO DEL NSCLC

1.8.1 NSCLC PRECOCE

Prima di procedere con la terapia della neoplasia è necessario effettuare un'accurata valutazione del paziente, considerando età, sesso, condizioni generali, eventuali comorbidità, interventi pregressi, allergie e performance status. Solo dopo aver valutato il paziente dal punto di vista cardio-polmonare, è possibile determinarne l'idoneità alla terapia. Nel tumore in stadio precoce, ovvero stadio I-II e alcuni casi selezionati di stadio III, il principale approccio terapeutico è dato dalla chirurgia, che consente una guarigione completa dalla neoplasia o comunque un significativo miglioramento della prognosi. Anche radioterapia e terapia sistemica assumono un ruolo importante, soprattutto nei pazienti in stadio II e III. In questo caso il cardine della programmazione terapeutica è la valutazione multidisciplinare (valutazione dei casi integrata di oncologo, chirurgo toracico, pneumologo, radioterapista, patologo, radiologo, medico nucleare).

CHIRURGIA

La chirurgia ha un ruolo fondamentale negli stadi precoci. Per minimizzare i rischi legati all'approccio chirurgico e favorire la possibilità di un trattamento radicale, viene incoraggiata l'afferenza a centri specialistici, con elevato volume di attività. Il concetto di operabilità include: operabilità biologica, che riguarda la possibilità di ottenere una radicalità oncologica in relazione allo stadio di malattia, operabilità anatomica, che indica il più piccolo volume possibile da asportare per ottenere una resezione radicale e infine operabilità funzionale, che riguarda previsioni sulla funzionalità cardio-respiratoria post-intervento.

È importante che la resezione chirurgica sia radicale, ovvero con margini di resezione liberi da malattia, e per ottenere ciò l'intervento ad intento radicale dev'essere effettuato in centri ad alta expertise che possano assicurare al paziente il miglior approccio di cura possibile ⁶. Accanto ad una chirurgia a margini negativi per neoplasia, la linfadenectomia rappresenta una componente fondamentale dell'atto operatorio. In particolare la lobectomia con rimozione dei linfonodi ilari

e mediastinici costituisce l'iter chirurgico più impiegato nel tumore in stadio precoce. La lobectomia può essere svolta tramite tecnica classica toracotomica, ma anche attraverso videotoracosopia, la quale è associata ad una minor invasività della procedura e ad un miglior decorso post-chirurgico. In caso di tumori molto precoci (Tis o T1A) o in pazienti che non possono andare incontro ad interventi di chirurgia maggiore, si procede in genere con la segmentectomia, sempre accompagnata da linfadenectomia ilo-mediastinica. In caso di neoplasia di dimensioni maggiori o con rilevante invasione oltre la scissura, può essere indicata, in casi selezionati, la rimozione totale del polmone (pneumectomia). La sopravvivenza a 5 anni dalla chirurgia dipende dallo stadio iniziale del tumore, passando dal 65-80% nello stadio I al 55% circa nello stadio II fino a meno del 40% negli stadi III selezionati ⁶.

RADIOTERAPIA

Nel caso di pazienti non operabili dal punto di vista funzionale o che rifiutano l'intervento chirurgico, una possibile opzione può essere la radioterapia stereotassica (SRBT), ovvero una radioterapia a dosi molto elevate, ma confinate in specifiche aree, controllando localmente la malattia e limitando le tossicità. Questa metodica consente di ottenere importanti risultati soprattutto in presenza di tumori polmonari a localizzazione periferica, dove si riescono a limitare effetti collaterali quali polmoni attiniche o atelettasie. Inoltre sembra che la radioterapia ha un ruolo nei pazienti con margini positivi R1 (sigla che si riferisce alla probabile presenza di residuo microscopico) ^{6,67}.

TERAPIA SISTEMICA ADIUVANTE

La chemioterapia adiuvante consiste nel somministrare un trattamento chemioterapico dopo la chirurgia in pazienti radicalmente operati ed è indicata nei pazienti operati in stadio IB-III A in buone condizioni generali e senza controindicazioni per l'utilizzo di un trattamento con doppietta a base di platino. ¹². In questi casi, dopo attenta valutazione del rapporto costo/beneficio, si procede con 4 cicli di cisplatino, combinato con un chemioterapico di terza generazione (quello più utilizzato è la vinorelbina). Questo approccio consente di ridurre la

mortalità di circa 5% a 5 anni, anche se esiste una quota di incremento di morti non cancro relate (circa 1% secondo l'aggiornamento dei dati di follow-up)⁶⁸. Recentemente è stato dimostrato che pazienti con neoplasie EGFR mutate in stadio IB-IIIa radicalmente operata hanno notevole beneficio dal trattamento con osimertinib per 3 anni, con riduzione complessiva del rischio di recidiva di circa 80% e effetto anche sulla sopravvivenza, nonostante il breve follow-up⁶⁹.

Il trattamento immunoterapico adiuvante ha dimostrato un vantaggio, seppur meno evidente, ed è attualmente indicato in pazienti radicalmente operati dopo trattamento chemioterapico adiuvante in presenza di livelli di espressione di PD-L1 di almeno 50%.

Per quanto riguarda il follow up di tali pazienti, è prevista una TC torace addome completo ogni 3 mesi per il primo biennio, ogni 6 mesi fino al quinto anno e infine annualmente dal sesto anno in poi. Tale metodica viene preferenzialmente effettuata con mezzo di contrasto. In caso di dubbi all'imaging, può essere indicata la PET-TC ed in casi selezionati (ad esempio malattie con presenza di alterazioni driver ad elevato rischio), viene integrata con imaging del distretto centrale⁶.

1.8.2 NSCLC LOCALMENTE AVANZATO

Quando si parla di NSCLC localmente avanzato ci si riferisce ad una neoplasia allo stadio III, che può essere distinta in resecabile e non resecabile sulla base delle dimensioni del tumore primitivo e del coinvolgimento linfonodale. È richiesta una valutazione multidisciplinare dal momento che si tratta di pazienti complessi dal punto di vista di gestione e terapia, che vanno valutati accuratamente per scegliere la strategia terapeutica migliore⁷⁰. Aspetto fondamentale del percorso del paziente con neoplasia in stadio localmente avanzato è rappresentato dalla stadiazione sistemica e accurata del coinvolgimento mediastinico mediante metodiche di imaging e spesso approfondimento bioptico⁶.

I tumori localmente avanzati "resecabili" comprendono quelli di stadio IIIA. Il coinvolgimento linfonodale mediastinico (N2) dovrebbe essere non "bulky" e riguardare una singola stazione. In questo caso il trattamento di scelta è rappresentato dalla chemioterapia preoperatoria seguita da chirurgia ad intento radicale^{6,71}. Numerosi studi hanno dimostrato un ruolo per trattamento chemio-

immunoterapico in questo contesto, ma il trattamento non è ancora disponibile da pratica clinica. Vengono invece definite neoplasie localmente avanzate non operabili le malattie con coinvolgimento linfonodale N3 o N2 bulky e/o multistazione. Il trattamento standard in questi casi, se clinicamente fattibile, è rappresentato dalla chemio-radioterapia concomitante, seguita da consolidamento immunoterapico (nei pazienti PD-L1 positivi). Attualmente la radioterapia raccomandata prevede schemi di 60-66Gy in 30-33 frazioni giornaliere, mentre per quanto riguarda il trattamento chemioterapico da adottare, si utilizza generalmente cisplatino in combinazione con etoposide, vinorelbina o paclitaxel. Quest'ultima combinazione è generalmente associata ad un miglior profilo di tossicità. Lo studio PACIFIC ha dimostrato nei pazienti trattati con durvalumab di consolidamento per un anno rispetto al placebo un aumento considerevole della sopravvivenza libera da malattia (PFS) (16,9 vs 5,6 mesi) e della sopravvivenza globale (OS) (47,5 vs 29,1 mesi) ⁷².

1.8.3 NSCLC AVANZATO

Si parla di tumore avanzato per lo stadio IV del NSCLC, in cui abbiamo la presenza di metastasi a distanza, e per gli stadi III non trattabili con terapie locoregionali. La strategia terapeutica viene valutata sulla base del quadro clinico del paziente, delle caratteristiche morfologiche all'esame istologico, delle mutazioni driver e dell'espressione di PD-L1. In questo stadio di malattia l'obiettivo della terapia è non è quello di portare a guarigione il paziente, ma è quello di prolungare la sopravvivenza e migliorare la qualità di vita ("palliazione") ⁶. Per la pianificazione terapeutica, vengono considerati fattori legati alla malattia (prevalentemente la caratterizzazione molecolare ma anche le sedi ed il carico di malattia), fattori legati al paziente (status funzionale, comorbidità, terapia farmacologica in atto, abitudine tabagica). Le neoplasie polmonari si distinguono per la strategia terapia terapeutica in "oncogene-addicted", ovvero caratterizzati dalla pleora di alterazioni molecolari suscettibili di una terapia target mirata, e tumori "non oncogene-addicted", in cui non sono presenti mutazioni o riarrangiamenti genetici rilevanti per intraprendere una strategia terapeutica molecolare ¹².

1.8.3.1 NSCLC NON ONCOGENE-ADDICTED

I tumori "non oncogene-addicted" sono quindi forme di NSCLC in cui non vengono riscontrate alterazioni molecolari per le quali esiste un trattamento biologico "a bersaglio molecolare". La strategia terapeutica si basa sul livello di espressione di PD-L1, sull'istotipo della neoplasia e sulle condizioni generali e comorbidità del paziente. In assenza di terapie a bersaglio molecolare, le principali alternative terapeutiche sono la chemioterapia e l'immunoterapia ⁶.

Negli ultimi anni l'immunoterapia è stata vera rivoluzione nel trattamento del carcinoma polmonare. La sensibilità all'immunoterapia del tumore del polmone sembra essere legato al tabagismo: il fumo di sigaretta ha infatti un'azione mutagenica in grado di creare degli antigeni non self, che possono rendere la malattia maggiormente "visibile" al sistema immunitario. Il presupposto fondamentale dell'immunoterapia è che il sistema immunitario normalmente è in grado di riconoscere gli antigeni self da quelli non self attraverso complessi meccanismi, ma le cellule neoplastiche possono mettere in atto delle strategie per fuggire dal controllo immunitario, senza quindi essere riconosciute e attaccate dai linfociti T ⁷³. Una di queste strategie è legata all'interazione ligando recettore a livello dei cosiddetti checkpoint immunitari tra cui PD1-PDL1 e CTLA-4-B7 1-2: la cellula tumorale esprime un ligando (PD-L1) che viene poi riconosciuto dalle cellule linfocitarie (esprimenti PD1) e mette in atto un meccanismo di tolleranza immunologica. Principalmente i farmaci sviluppati in questo ambito sono anticorpi monoclonali anti-PD1 (pembrolizumab e nivolumab), gli anti-PDL1 (atezolizumab e durvalumab) e gli anti-CTLA-4 (ipilimumab). Il PD-L1, espresso dalle cellule tumorali e dalle cellule infiltranti la neoplasia, è ad oggi il fattore predittivo maggiormente impiegato nella pratica clinica per prevedere la risposta all'immunoterapia. Quando ci si trova di fronte ad un NSCLC in stadio avanzato, non sottoposto in precedenza a trattamento, senza alterazioni molecolari target e con un PD-L1 maggiore o uguale al 50%, il trattamento d'elezione è rappresentato da pembrolizumab, atezolizumab o cemiplimab. Lo studio di fase III KEYNOTE 024 è stato il primo a dimostrare che l'utilizzo in prima linea del pembrolizumab porta ad una sopravvivenza globale maggiore rispetto al trattamento chemioterapico⁷⁴. All'interno degli NSCLC con PD-L1 < del 50%, una distinzione importante da fare

per la scelta dell'iter terapeutico è quella tra neoplasie squamose e neoplasie non squamose. In caso di NSCLC avanzato non squamoso con PD-L1 < del 50% e buon PS, si ha indicazione ad un approccio terapeutico che prevede 4 cicli a base di platino, pemetrexed e pembrolizumab seguiti, in caso di risposta o patologia stabile, da un trattamento di mantenimento a base di pemetrexed e pembrolizumab. In caso invece di NSCLC avanzato squamoso con PD-L1 < del 50% e buon PS, è indicato il trattamento in prima istanza con carboplatino, paclitaxel e pembrolizumab per 4 cicli, dopo i quali se il paziente risponde o la malattia è stabile, si procede con pembrolizumab in monoterapia. Infine, gli studi CheckMate227 e CheckMate 9LA hanno dimostrato che la chemioterapia combinata con nivolumab-ipilimumab mostra una PFS ed una OF migliori rispetto alla sola chemioterapia in pazienti non trattati in precedenza indipendentemente dal livello di espressione del PD-L1 ^{6,75}.

1.8.1.2 NSCLC ONCOGENE-ADDICTED

I tumori oncogene-addicted sono caratterizzati dalla presenza di alterazioni molecolari contro cui possono essere utilizzati farmaci a bersaglio molecolare specifici con risultati significativi sull'outcome del paziente. Le mutazioni driver si distinguono in "druggable", direttamente bersagliate dal farmaco, e "actionable", appartenenti a pathways su cui si può intervenire con trattamenti farmacologici ⁶. Dunque in caso di tumore non a piccole cellule avanzato, la caratterizzazione molecolare è una componente fondamentale nella decisione terapeutica in virtù dei grandi benefici che può portare qualora il paziente presenti alterazioni molecolari target, quali mutazioni di EGFR, riarrangiamenti di ALK o ROS1, mutazioni di BRAF e NTRK, alterazioni di MET o RET ^{6,76}. I farmaci a bersaglio molecolare hanno radicalmente migliorato outcome e qualità di vita rispetto alla chemioterapia convenzionale. Una caratteristica tipica è quello dello sviluppo, dopo un certo periodo di tempo, di meccanismi di resistenza acquisita. Tali meccanismi si distinguono in meccanismi on target, come mutazioni o amplificazioni dello stesso bersaglio molecolare oppure meccanismi off target,

come alterazioni molecolari che rendono la neoplasia indipendente dal farmaco a bersaglio molecolare tramite l'attivazione di vie alternative.

NSCLC CON MUTAZIONE DI EGFR

EGFR mutato si riscontra nel 10-15% delle diagnosi di adenocarcinoma nei caucasici e il 90% delle mutazioni di questo recettore è dato dalla delezione dell'esone 19 e dalla mutazione L858R dell'esone 21, che rappresentano le cosiddette "mutazioni classiche". In presenza di NSCLC avanzato con tali mutazioni, bisogna utilizzare farmaci inibitori tirosin-chinasici (TKIs) di EGFR, che sono risultati essere superiori rispetto al trattamento chemioterapico standard ⁷⁷. Le mutazioni di EGFR sono generalmente associata ad una mancata (o molto limitata) esposizione al fumo di sigaretta e ad una mancata risposta all'immunoterapia. Il trattamento sistemico delle neoplasie EGFR mutate si basa sull'utilizzo di TKI di EGFR. Nel NSCLC avanzato con mutazioni di EGFR, inibitori di prima generazione gefitinib e afatinib si sono dimostrati superiori rispetto alla chemioterapia con PFS, OS e risposta all'imaging migliori ^{78,79}. Anche afatinib, TKI anti EGFR di seconda generazione, si è dimostrato superiore ai chemioterapici, nonostante non abbia mostrato significativi miglioramenti rispetto alla prima generazione ⁸⁰. Dopo lo studio FLAURA, osimertinib, TKI di terza generazione, è stato introdotto come terapia di prima linea nei pazienti con NSCLC localmente avanzato o metastatico in virtù della maggior efficacia in termini di PFS e OS, della migliore risposta a livello cerebrale e della migliore tollerabilità ⁸¹. A progressione da osimertinib in prima linea, il trattamento standard da pratica clinica è rappresentato dalla chemioterapia con doppietta a base di platino, anche se è fortemente consigliata, se possibile, l'inclusione in studi clinici.

NSCLC CON RIARRANGIAMENTO DI ALK

La malattia ALK riarrangiate si caratterizza per un andamento generalmente aggressivo, con elevata tendenza al coinvolgimento centrale. Si tratta di malattie generalmente sensibili alla chemioterapia e non all'immunoterapia. Il cardine del trattamento è rappresentato dall'utilizzo di farmaci a bersaglio molecolare, in

grado di inibire ALK. Il loro utilizzo si associa ad un netto beneficio in termini di sopravvivenza e qualità di vita. In caso di pazienti aventi NSCLC avanzato con ALK riarrangiato, il primo farmaco a bersaglio molecolare che ha dimostrato superiorità rispetto alla chemioterapia standard è crizotinib, inibitore tirosin-chinasico di prima generazione ⁸². Successivamente inibitori di nuova generazione hanno dimostrato superiorità rispetto a crizotinib, dimostrandosi efficaci nel procrastinare lo sviluppo di resistenza acquisita e nettamente superiori in termini di attività a livello centrale⁸³. Al momento per il trattamento sistemico di prima linea, è indicato trattamento con alectinib o brigatinib, mentre a progressione da alectinib, è approvato l'utilizzo di lorlatinib ⁸³⁸⁴.

NSCLC CON ROS-1 RIARRANGIATO

Le malattie con riarrangiamento di ROS1 tendono ad avere andamento aggressivo, se non adeguatamente trattate, e sono caratterizzate da una notevole propensione per il coinvolgimento centrale. Nei pazienti con NSCLC avanzato portatori di riarrangiamento di ROS1, il trattamento standard di prima linea è rappresentato dall'utilizzo di inibitori di ROS1: crizotinib, il primo di dimostrata efficacia o entrectinib. Quest'ultimo ha dimostrato maggior efficacia a livello centrale. Non vi sono trattamenti a bersaglio molecolare approvati in Italia a progressione da crizotinib o entrectinib; tuttavia una rilevante quota di pazienti manifesta meccanismi di resistenza acquisita legati all'insorgenza di mutazioni secondarie a carico di ROS1. Quella più frequente è la sostituzione G2032R⁶²⁸⁵. Lorlatinib ha dimostrato di essere sensibile nei pazienti con riarrangiamento di ROS1 e mutazione G2032R ⁸⁵.

NSCLC CON BRAF MUTATO

Nei pazienti con neoplasia avanzata e mutazione di BRAF V600E, il trattamento in indicazione in prima linea è rappresentato dall'associazione di dabrafenib, inibitore di BRAF, e trametinib, inibitore di MEK (molecolare che agisce a valle di BRAF)⁸⁶. A progressione dalla prima linea di terapia, attualmente non sono disponibili ulteriori linee di trattamento a bersaglio molecolare e la scelta terapeutica si basa sulle condizioni generali del paziente, il livello del PD-L1 e la

storia di fumo di sigaretta, più eterogenea rispetto alle altre alterazioni molecolari sino ad ora descritte.

NSCLC CON FUSIONI DI RET

In presenza di fusione di RET sono stati approvati nella pratica clinica due inibitori di RET dopo progressione a immunoterapia e/o chemioterapia a base di platino: selpercatinib e pralsetinib. Nello studio di A. Drilon et al è stata dimostrata l'efficacia del trattamento a base di selpercatinib in pazienti con NSCLC avanzato positivo alla fusione di RET, con una percentuale di risposta al trattamento che è risultata minore nei pazienti trattati in precedenza con chemioterapia a base di platino rispetto a quelli naive al trattamento ⁸⁷. Nello studio di fase I/II ARROW si è risultato promettente l'utilizzo di pralsetinib in pazienti con NSCLC positivo alla fusione di RET ⁸⁸.

NSCLC CON MUTAZIONI DI MET

In caso di mutazioni a carico di MET, in particolare nello skipping dell'esone 14 di tale gene rilevato alla biopsia liquida o tissutale, sembra promettente l'utilizzo di tepotinib ⁸⁹. Invece nello studio di Ibiayi Dagogo-Jack et al viene dimostrata una modesta attività di capmatinib nei pazienti affetti da NSCLC con mutazione di MET precedentemente trattati con crizotinib⁹⁰. Nel caso invece di NSCLC con EGFR mutato che va incontro a progressione a causa dell'amplificazione di MET, lo studio TATTON mostra come la terapia combinata con savolitinib (inibitore di MET) e osimertinib (inibitore di EGFR) sembra promettente in questi pazienti ⁹¹.

1.9 BIOPSIA LIQUIDA

Nella gestione clinica moderna del NSCLC avanzato, la caratterizzazione molecolare riveste un ruolo fondamentale. Nonostante l'analisi molecolare del campione tissutale neoplastico sia ad oggi l'approccio standard, la possibilità di analizzare il materiale genetico tumorale nel sangue prelevato dal paziente per valutare lo stato mutazionale della malattia rappresenta un grande passo in avanti della ricerca degli ultimi anni. Ciò è possibile perché le cellule tumorali sono in grado di

rilasciare macromolecole nel flusso sanguigno, sia da siti primari che metastatici. Tali molecole sono stabili e mantengono le caratteristiche genetiche ed epigenetiche distintive delle cellule da cui provengono. I saggi in grado di campionare, isolare e testare gli analiti da un fluido biologico sono indicati come biopsia liquida. Vari analiti biologici possono essere isolati dal sangue periferico, ad esempio DNA tumorale circolante (ctDNA), cellule tumorali circolanti (CTC), esosomi circolanti, RNA piastrinico e ctRNA. Il ctDNA è sicuramente quello più studiato e rappresenta una frazione del cfDNA (cell free DNA) totale, il quale comprende DNA tumorale e DNA derivante da cellule non tumorali. Il ctDNA può essere testato per la presenza di mutazioni somatiche, variazioni del numero di copie geniche (CNV) e riarrangiamenti genici e presenta inoltre un buon tasso di concordanza con l'analisi tissutale⁹². Nel tempo sono stati sviluppati diversi metodi analitici per l'identificazione di alterazioni molecolari nel ctDNA. Distinguiamo approcci ristretti che si basano principalmente sulla PCR e approcci ampi che si basano soprattutto sull'NGS. La possibilità di analizzare il plasma per valutare lo stato mutazionale della malattia offre indubbi vantaggi rispetto al campionamento tissutale standard: è una procedura semplice da eseguire e minimamente invasiva, è ripetibile in diversi momenti della malattia, può essere effettuata in pazienti critici che non possono essere sottoposti a biopsia tissutale ed è utile alla diagnosi nel caso in cui i campioni tissutali non siano disponibili. Nella pratica clinica, la biopsia liquida viene utilizzata nella malattia EGFR mutata in due momenti: in mancanza di tessuto disponibile per la valutazione di NSCLC avanzati al basale oppure in caso di progressione ai TKIs di prima o seconda generazione per valutare la presenza della mutazione di resistenza T790M. Tuttavia già numerosi studi hanno dimostrato come i campi di applicazione della biopsia liquida possano essere in realtà molto più ampi. Negli ultimi anni la biopsia liquida è diventata uno strumento versatile della medicina di precisione potendo essere utilizzata per numerosi scopi, quali individuazione di mutazioni driver che possono essere oggetto di terapia molecolare specifica, monitoraggio della risposta al trattamento e dell'evoluzione tumorale, identificazione di meccanismi di resistenza alla terapia, valutazione del tumor mutational burden (TMB) e predizione di progressione di malattia^{92,93}.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Il trattamento a bersaglio molecolare nelle neoplasie EGFR mutate ha notevolmente migliorato la prospettiva dei pazienti in termini di sopravvivenza e qualità di vita. Nonostante ciò, vi è una discreta eterogeneità in termini di durata del beneficio clinico ed inevitabilmente tutti i pazienti sviluppano meccanismi di resistenza acquisita.

Lo studio REM ha l'obiettivo di valutare prospetticamente il ruolo della biopsia liquida in pazienti con mutazione di EGFR e trattati in prima linea con osimertinib. I due principali obiettivi sono la descrizione della variazione del profilo molecolare al basale ed al momento della resistenza acquisita mediante analisi NGS e la valutazione del ruolo predittivo della variazione della presenza della mutazione di EGFR nel plasma dopo un breve periodo di trattamento con osimertinib.

Il lavoro di tesi consiste nella raccolta prospettica dei dati clinici e radiologici del primo gruppo di pazienti arruolati e nella valutazione del ruolo predittivo del monitoraggio dinamico della mutazione di EGFR nel plasma.

In particolare stabilire la correlazione tra variazioni della mutazione nel plasma rilevate precocemente dopo l'inizio della terapia e outcome dei pazienti EGFR mutati potrebbe essere poi utilizzata per personalizzare il trattamento dei pazienti. In questo modo si potrebbero scegliere eventualmente combinazioni farmacologiche più efficaci rispetto alla sola terapia con osimertinib, come l'associazione di chemioterapia e osimertinib in presenza di variazioni della mutazione nel plasma associate ad un outcome peggiore.

3. MATERIALI E METODI

3.1 DISEGNO DI STUDIO

Lo studio è di tipo prospettico traslazionale non interventistico.

Tutti i pazienti EGFR mutati afferenti ai centri coinvolti e in grado di ricevere da pratica clinica trattamento con terapia a bersaglio molecolare con osimertinib vengono inclusi, previa firma del consenso informato, nello studio.

Lo studio prevede una valutazione molecolare sistematica su tessuto e plasma al basale e al momento della progressione. I prelievi per biopsia liquida sono quindi raccolti al basale (T0) e al momento della progressione radiologica (T3). Inoltre vengono eseguite ulteriori biopsie liquide dopo 10 +/-3 (T1) e 28 +/-3 (T2) giorni di trattamento. Le analisi molecolari pianificate prevedono l'analisi NGS su tessuto e plasma al basale e al momento della progressione e l'analisi mediante digital droplet PCR (ddPCR) della mutazione di EGFR su plasma al T0, T1 e T2.

Lo studio è stato al momento approvato dal comitato etico del centro coordinatore (Istituto Oncologico Veneto) e di alcuni centri satelliti, quali l'UOC Oncoematologia dell'Ospedale San Bassano AULSS7 Pedemontana e l'UOC Oncologia dell'Ospedale San Bortolo di Vicenza AULSS 8 Berica.

I dati clinici dei pazienti inclusi nello studio sono stati prospetticamente raccolti e le immagini radiologiche sono state riviste. Al momento dell'analisi per la presente tesi, sono stati raccolti i dati clinico-radiologici dei primi 34 pazienti arruolati e sono state eseguite le correlazioni della variazione della mutazione nel plasma al T1 e T2 con la risposta al trattamento.

3.2 OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'obiettivo principale del presente studio è quello di valutare il ruolo predittivo delle variazioni della presenza di mutazione nel plasma al T2 in termini di risposta al trattamento. Obiettivi secondari sono l'osservazione di attività e tolleranza di osimertinib in prima linea nella pratica clinica e l'osservazione dell'attività del farmaco in presenza di mutazioni "non comuni" o composte.

3.3 CRITERI DI INCLUSIONE ED ESCLUSIONE

I soggetti per poter essere arruolati nello studio devono soddisfare tutti i criteri di inclusione, mentre è sufficiente che sia soddisfatto uno solo dei criteri di esclusione per il mancato arruolamento del soggetto nello studio.

CRITERI DI INCLUSIONE

1. Ottenimento del consenso informato da parte del paziente prima di procedere con l'iter dello studio;
2. Pazienti di sesso maschile o femminile di età pari o superiore a 18 anni;
3. Pazienti con diagnosi di NSCLC avanzato aventi mutazioni classiche di EGFR. Le mutazioni rare dell'EGFR saranno discusse con il ricercatore principale e il coordinatore dello studio per l'inclusione;
4. Fattibilità clinica della terapia di prima linea con osimertinib, secondo il processo decisionale del medico curante;
5. Compliance adeguata secondo la valutazione del medico curante;
6. Performance status secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) compreso tra 0-2 (o analogo performance status secondo l'Eastern Cooperative Oncology Group);
7. I pazienti devono avere un'aspettativa di vita superiore o uguale alle 12 settimane.

CRITERI DI ESCLUSIONE

1. Qualsiasi controindicazione all'utilizzo di osimertinib, secondo il processo decisionale del medico curante. Le principali controindicazioni suggerite agli Oncologi sono:
 - Vomito o nausea refrattari, malattie gastrointestinali croniche, incapacità di deglutire una formulazione, pregressa resezione intestinale che impedisca un adeguato assorbimento di osimertinib;
 - Intervallo QT corretto a riposo (QTc) > 470 millisecondi prima dell'inizio del trattamento;

- Qualsiasi anomalia clinicamente rilevante nel ritmo, nella conduzione o nella morfologia dell'ECG a riposo, come ad esempio: blocco di branca sinistro completo o blocco atrio-ventricolare di secondo o terzo grado;
 - Pazienti aventi fattori in grado di aumentare il rischio di prolungamento dell'intervallo QTc o il rischio di eventi aritmici, come ad esempio: insufficienza cardiaca, anomalie elettrolitiche, sindrome del QT lungo, storia familiare di sindrome del QT lungo, morte improvvisa inspiegabile sotto i 40 anni di età in parenti di primo grado oppure qualsiasi terapia concomitante in grado di prolungare l'intervallo QT e causare torsioni di punta;
 - Presenza in anamnesi di malattia polmonare interstiziale, patologia polmonare interstiziale indotta da farmaci o polmonite da radiazioni che ha richiesto un trattamento con steroidi oppure qualsiasi evidenza di malattia polmonare interstiziale clinicamente attiva;
 - Insufficiente riserva di midollo osseo o inadeguata funzione d'organo;
 - In anamnesi presenza di ipersensibilità agli eccipienti attivi o inattivi di osimertinib o farmaci con struttura chimica o classe simile a osimertinib;
2. Il paziente non deve partecipare allo studio se è improbabile che il paziente rispetti le procedure, le restrizioni e i requisiti dello studio.

3.4 RACCOLTA DEI DATI

Attraverso la consultazione nella piattaforma Oncosys delle cartelle cliniche dei pazienti sono stati raccolti per ogni paziente i seguenti dati:

- Caratteristiche del paziente:
 - Sesso
 - Storia di fumo
 - Data della diagnosi di stadio avanzato
 - Pregresso intervento chirurgico al polmone
 - Performance status alla diagnosi di stadio avanzato, secondo ECOG score

- Caratteristiche della malattia:
 - Istologia tumorale
 - Caratterizzazione molecolare per terapia a bersaglio molecolare
 - PD-L1 TPS
 - Stadio alla diagnosi di malattia avanzata
 - Numero e sedi di metastasi
- Riguardo il trattamento con osimertinib, sono stati raccolti i seguenti dati:
 - Data di inizio terapia
 - Miglior risposta alla terapia
 - Progressione di malattia dopo l'inizio della terapia
 - Stop della prima linea di terapia
 - Sopravvivenza libera da malattia
 - Eventuali trattamenti loco-regionali concomitanti con particolare attenzione a quelli cerebrali
 - Tipologia e grado (secondo CTCAE v5.0) di irAE
 - Interruzione temporanea o definitiva della terapia a causa della tossicità
 - Numero di linee terapeutiche dopo la terapia di prima linea con osimertinib
 - EGFR ISQ relativo ai vari time-points previsti dallo studio

3.5 ANALISI MOLECOLARI

I campioni di plasma verranno raccolti prima dell'inizio della terapia con osimertinib (T0, entro 7 giorni), dopo 10 (+/-3) giorni (T1), dopo 28 (+/-3) giorni. Al momento dei prelievi, vengono raccolti 20 ml di sangue in provette Streck, che permettono una maggior stabilità e la possibilità di processare il campione entro 4-5 giorni dal prelievo. La processazione è comunque avvenuta entro 4-72 ore dal

prelievo. Il plasma viene processato e conservato a -80 °C per poi procedere con l'estrazione del cfDNA. Per le analisi di real-time PCR (eseguite al T0, T1 T2), il DNA viene estratto a partire da 2 ml di plasma utilizzando il Cobas cfDNA sample preparation kit (Roche Diagnostics). Il kit utilizzato per la real-time PCR è il CE IVS Cobas EGFR Mutation Test v2.

3.6 ANALISI STATISTICA

L'endpoint primario dello studio di tesi è di valutare il ruolo predittivo delle variazioni della presenza di mutazione nel plasma al T2 rispetto al T0 in termini di risposta radiologica al trattamento.

L'esito della biopsia liquida viene valutato in termini di presenza/assenza di mutazione di EGFR ai diversi punti temporali in cui è avvenuto il prelievo.

Tra i pazienti in cui la mutazione di EGFR era rilevabile nel plasma al basale, si definisce come clearance l'assenza della mutazione ad un punto temporale successivo al primo.

Un indice semiquantitativo (ISQ) relativo alla quantità di cfDNA EGFR mutato presente nel campione plasmatico è stato ricavato dalla real-time PCR, secondo le indicazioni date nel manuale di produzione del kit.

La risposta radiologica è stata definita in accordo con i criteri RECIST v1.1⁹⁴.

Con risposta completa (CR) si considera la scomparsa di tutte le lesioni definite al basale come target e delle lesioni non target, con risposta parziale (PR) si considera una diminuzione di almeno il 30% nella somma dei diametri delle lesioni target (prendendo come riferimento la somma dei diametri al basale), con progressione di malattia (PD) si intende un incremento di almeno il 20% nella somma dei diametri delle lesioni target (prendendo come riferimento la più piccola somma nello studio) e/o la comparsa di nuove lesioni, con malattia stabile (SD) si considera una riduzione della somma dei diametri delle lesioni target inferiore al 30% o di un aumento dello stesso inferiore al 20%.⁹⁴.

La PFS è calcolata come il tempo che va dall'inizio del trattamento sistemico (T0) alla progressione radiologica o alla morte per qualsiasi causa. L' OS è calcolata come il tempo che va da dall'inizio del trattamento sistemico (T0) alla morte per

qualsiasi causa. L'OS e la PFS mediane sono state stimate attraverso metodo di Kaplan-Meier. L'associazione di variabili clinico-patologiche con PFS e OS è stata calcolata mediante regressione di Cox.

Per valutare l'associazione tra risposta e biopsia liquida sono stati considerati i seguenti parametri: clearance al T1, clearance al T2, riduzione di ISQ di almeno 50% al T1, riduzione di ISQ di almeno 50% al T2. Per ciascun parametro molecolare è stato calcolato odds ratio mediante metodo di regressione logistica. Per definire l'associazione tra presenza/assenza di mutazione nel plasma e carico di malattia, il carico di malattia è stato definito secondo il numero di sedi metastatiche ed è stato utilizzato il cut-off di almeno tre sedi per definire il carico di malattia "alto".

4. RISULTATI

4.1 CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE IN STUDIO

4.1.1 CARATTERISTICHE CLINICHE

Al momento dell'analisi per la presente tesi, sono stati inclusi 34 pazienti. Le caratteristiche cliniche della popolazione in studio sono state raccolte nella tabella sottostante (tabella VI). Analizzando la tabella VI si evince che l'età mediana alla diagnosi di malattia avanzata è risultata pari a 70,5 anni (IQR: 67-77), e il sesso prevalente è stato quello femminile rispetto al maschile, con rispettivamente 24 pazienti (70,6%) e 10 pazienti (29,4%). I soggetti non fumatori sono risultati essere 23 (67,6%) al contrario degli 11 fumatori (32,3%). Di questi ultimi è stato riscontrato solamente un fumatore attivo (2,9%), mentre i restanti 10 (29,4%) sono risultati essere ex fumatori. Dalla valutazione clinica precedente all'inizio della terapia di prima linea con osimertinib, 30 pazienti (88,2%) hanno manifestato un ECOG PS compreso tra 0 e 1 e quattro pazienti (11,8%) un ECOG PS superiore a 1 ed interventi chirurgici pregressi al polmone erano riscontrabili in sei pazienti (17,6%). Dal punto di vista della caratterizzazione istologica, i pazienti in studio che hanno sviluppato un adenocarcinoma sono stati 32 (94,1%) rispetto a quelli con carcinoma squamoso che sono stati solamente due (5,9%). 32 pazienti (94,1%) si trovavano allo stadio IV, di cui 14 (41,2%) in stadio IVA e 18 (52,9%) in stadio IVB, e due (5,9%) si trovavano allo stadio III. I pazienti con due o meno siti metastatici alla diagnosi sono stati 28 (82,4%), mentre quelli con più di due siti metastatici alla diagnosi sono stati sei (17,6%). La sede metastatica più frequente è stata l'osso con 17 pazienti coinvolti (50%), le metastasi cerebrali sono state rilevate in tre pazienti (8,8%) e quelle epatiche in tre pazienti (8,8%).

CARATTERISTICHE	VARIABILI	VALORE	%
Età mediana (anni)		70,5	IQR: 67-77
Sesso	M	10	29,4
	F	24	70,6
Fumo di sigaretta	Non fumatore	23	67,6
	Ex fumatore	10	29,4
	Fumatore attivo	1	2,9
ECOG PS	0-1	30	88,2
	> 1	4	11,8
Chirurgia pregressa	si	6	17,6
	no	28	82,4
Istologia	adenocarcinoma	32	94,1
	carcinoma squamoso	2	5,9
Stadio alla diagnosi di malattia avanzata	IIIB	2	5,9
	IVA	14	41,2
	IVB	18	52,9
Metastasi alla diagnosi	0-2	28	82,4
	>2	6	17,6
	cerebrali	3	8,8
	epatiche	3	8,8
	ossee	17	50

Tabella VI. Caratteristiche cliniche dei pazienti in studio.

4.1.2 CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

ALTERAZIONI MOLECOLARI RICERCATE AL BASALE

Come riportato nella tabella VII sottostante, nella popolazione in studio la caratterizzazione molecolare al basale è stata la seguente:

-lo stato mutazionale di EGFR è stato ricercato su tessuto e plasma in 34 pazienti, quindi tutti i pazienti arruolati nello studio (100%) con la presenza di almeno una mutazione di EGFR su tessuto in ciascun paziente;

-lo stato mutazionale di ALK è stato ricercato in 31 pazienti (91,18%) senza ottenere la positività mutazionale in tutti i casi analizzati;

-lo stato mutazionale di ROS-1 è stato ricercato in 31 pazienti (91,18%) senza la presenza di pazienti positivi a tale mutazione;

-la valutazione dello stato di PD-L1 ha portato ai seguenti risultati: tra i 27 pazienti testati (79,41%), 11 pazienti (32,35%) hanno presentato un PD-L1 inferiore all'1%, 11 pazienti (32,35%) hanno presentato un PD-L1 compreso tra l'1% e il 49% e cinque pazienti (14,71%) hanno presentato un PD-L1 superiore al 49%.

Analisi molecolari al basale	N°	(%)
Valutazione stato di EGFR	34	100,00
Alterazioni driver	34	100,00
Valutazione stato di ALK	31	91,18
Alterazioni driver	0	0,00
Valutazione stato di ROS1	31	91,18
Alterazioni driver	0	0,00
Valutazione stato di PD-L1	27	79,41
PD-L1 < 1	11	32,35
PD-L1 1 - 49	11	32,35
PD-L1 > 49	5	14,71
PD-L1 non tested	7	20,59
TOTALE	34	100,00

Tabella VII. Alterazioni molecolari testate nella popolazione in studio.

Analizzando più nel dettaglio le mutazioni di EGFR rilevate nella popolazione in studio otteniamo il seguente grafico a torta (figura 4).

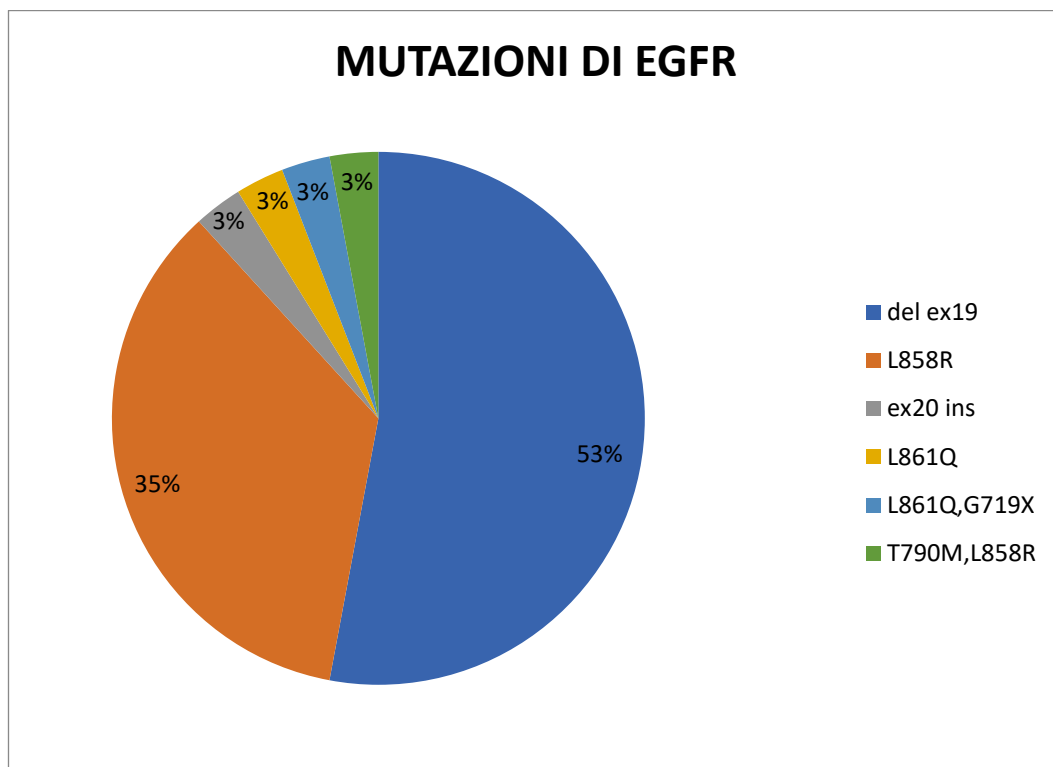


Figura 4. Mutazioni di EGFR riscontrate nei pazienti arruolati nello studio.

Dall'analisi mutazionale di EGFR è emerso quindi che:

- la mutazione più frequentemente riscontrata nella popolazione in studio è stata la delezione dell'esone 19 che ha riguardato 18 pazienti (52,9%)
 - la seconda mutazione più frequente è stata la sostituzione L858R a carico dell'esone 21, rilevata in 12 pazienti (35,3%)
 - le mutazioni più rare hanno riguardato solamente un paziente ciascuna (2,9%).
- Tra di esse sono state riscontrate l'inserzione a livello dell'esone 20, la sostituzione L861Q dell'esone 21, la presenza contemporanea delle sostituzioni L861Q e G719X e la presenza simultanea delle sostituzioni T790M e L858R.

4.2 DATI SUL TRATTAMENTO

4.2.1 DURATA DEL TRATTAMENTO E CAUSE DI INTERRUZIONE DELLA TERAPIA

Per ciascun paziente in studio sono state riportate la data di inizio e la data di fine del trattamento di prima linea con osimertinib. La durata mediana della terapia di prima linea è stata pari a 6,46 mesi con valore minimo registrato pari a 0,63 mesi e valore massimo registrato pari a 21,15 mesi. Sono risultati essere sette i pazienti (20,5%) che hanno interrotto il trattamento di prima linea: quattro pazienti (11,7%) hanno interrotto il trattamento al momento del decesso legato in due casi a progressione di malattia e in due casi non correlato alla malattia, mentre tre pazienti (8,8%) hanno interrotto il trattamento alla progressione clinica e radiologica di malattia e hanno iniziato un trattamento di seconda linea.

4.2.2 EFFICACIA DEL TRATTAMENTO

Nella popolazione in studio l'efficacia del trattamento di prima linea con osimertinib è stata valutata sulla base della miglior risposta dei pazienti alla terapia. I risultati sono stati i seguenti:

- 24 pazienti (71%) hanno presentato una risposta parziale alla terapia
- sette pazienti (20%) hanno manifestato una sostanziale stabilità di malattia
- due pazienti (6%) hanno presentato progressione di malattia
- un paziente (3%) non era valutabile per la risposta radiologica perché non ha eseguito l'esame radiologico per scadimento delle condizioni generali.

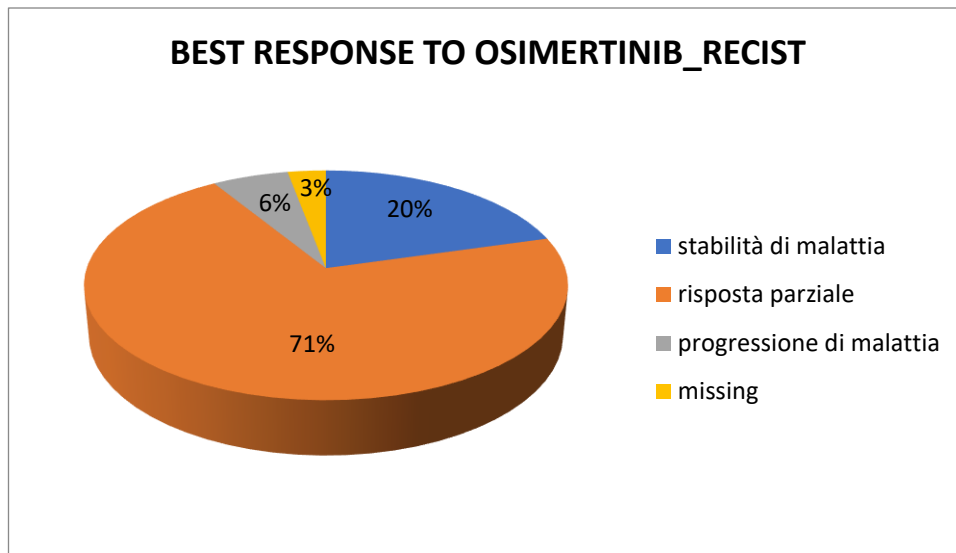


Figura 5. Miglior risposta alla terapia di prima linea con osimertinib.

Visto il breve follow-up disponibile, non è stato possibile stimare la mediana di PFS. Gli eventi registrati per la PFS sono stati cinque sul totale di 34 (14,7%). La mediana di OS è stata pari a 21,15 mesi (IC 95%: 10,48-31,81 mesi) e il numero di pazienti deceduti è risultato essere pari a sette sul totale di 34 (20,5%).

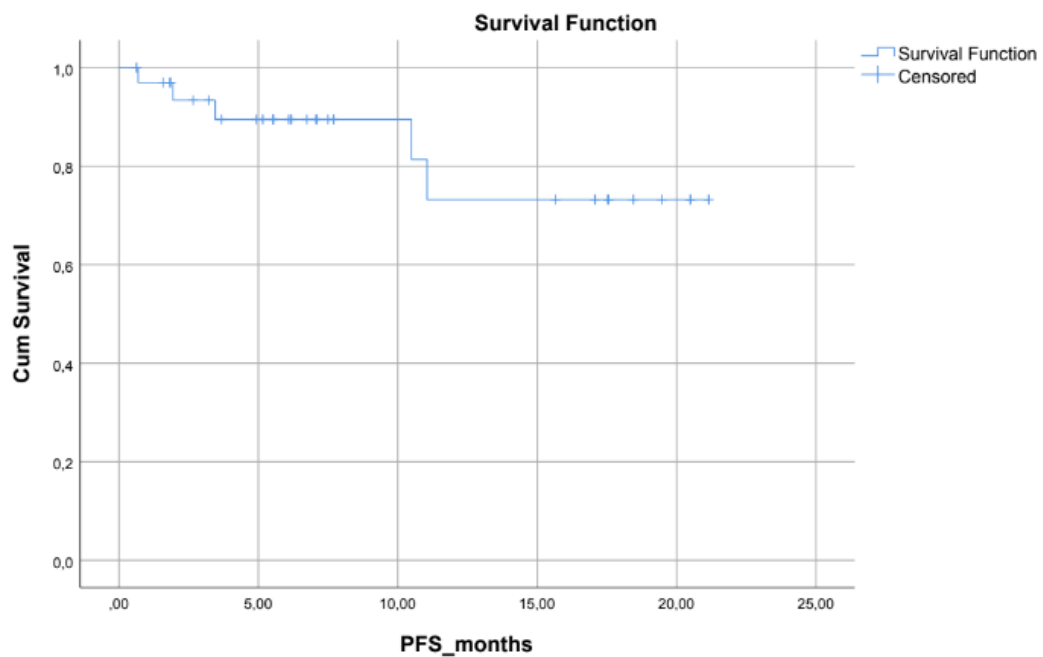


Figura 6. Curva di Kaplan-Meier per la PFS del campione.

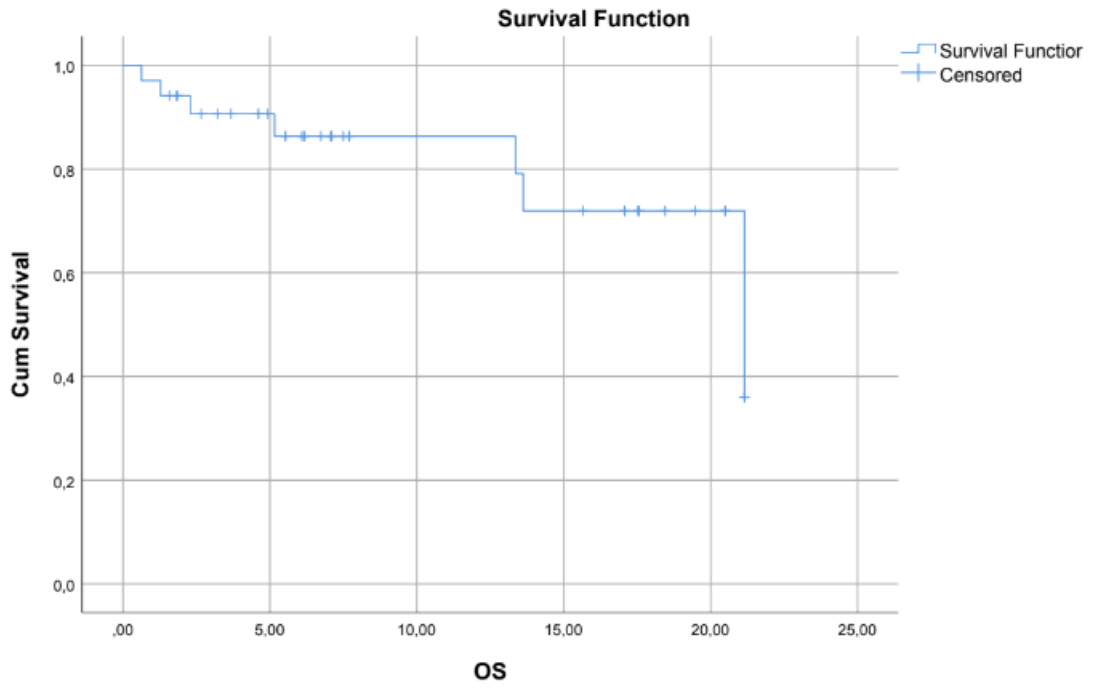


Figura 9. Curva di Kaplan-Meier per l'OS del campione.

4.2.3 TOSSICITA' DELLA TERAPIA

TIPOLOGIA TOSSICITA'	N°	G 1-2	G 3-4
	%		
Diarrea	15	15	0
	44,12	44,12	0
Rash cutaneo	13	13	0
	38,23	38,23	0
Tossicità polmonare	1	1	0
	2,94	2,94	0
Secchezza cutanea	8	8	0
	23,52	23,52	0
Prurito	0	0	0
	0,00	0	0
Paronichia	8	8	0
	23,52	23,52	0
Stomatite	2	2	0
	5,88	5,88	0
Cherarite	0	0	0
	0,00	0	0
Piastrinopenia	6	6	0
	17,64	17,64	0
Leucopenia	1	0	1
	2,94	0	2,94
Neutropenia	1	0	1
	2,94	0	2,94
Tromboembolismo	1	1	0
	2,94	2,94	0
Aumento creatinina	0	0	0
	0,00	0	0
TOTAL	34		

Tabella VIII. Tossicità correlate alla terapia di prima linea con osimertinib suddivise per grado secondo CTCAE v 5.0

Come si evince dalla tabella soprastante, nella popolazione in studio le tossicità più frequentemente riscontrate sono state la diarrea con 15 pazienti coinvolti (44,12%) e il rash cutaneo con 13 pazienti coinvolti (38,23%). La secchezza cutanea e la paronichia hanno colpito ciascuna otto pazienti (23,52%), la piastrinopenia ha coinvolto sei pazienti (17,64%), la leucopenia (neutropenia) ha colpito un paziente (2,94%) e il tromboembolismo anch'esso un paziente (2,94%). Le tossicità

riscontrate sono state tutto di grado lieve/moderato (G1-2) ad eccezione di un caso di neutropenia G3, che non si è associato a complicanze infettive.

4.2.4 TRATTAMENTI DI SECONDA LINEA

Nella maggioranza dei pazienti inclusi nello studio, il trattamento di prima linea con osimertinib è tutt'ora in atto. Sette pazienti (20,5%) hanno interrotto il trattamento di prima linea: quattro pazienti (12,7%) hanno interrotto il trattamento al decesso legato in due casi a progressione di malattia e in due casi non correlato alla malattia, mentre tre pazienti (8,8%) hanno interrotto il trattamento in seguito a progressione clinica e radiologica di malattia e hanno iniziato una terapia di seconda linea. Tra questi ultimi, due pazienti hanno intrapreso una seconda linea chemioterapica secondo pratica clinica (carboplatino +paclitaxel in un paziente e carboplatino+pemetrexed nell'altro paziente) ed il restante paziente, data la presenza dell'inserzione dell'esone 20, è stato trattato con mobocertinib (inibitore tirosin-chinasico specifico per tale mutazione).

4.2.5 VARIABILI CLINICHE E SOPRAVVIVENZA

Sono state considerate le seguenti caratteristiche per valutarne il potenziale impatto sulla prognosi dei pazienti in studio: genere, età alla diagnosi di stadio avanzato, storia di fumo, chirurgia pregressa, istologia, tipologia mutazioni, % PD-L1, ECOG PS, stadio alla diagnosi, numero e sedi di metastasi, risposta al trattamento. Tra le variabili cliniche considerate nella popolazione in studio, nessuna ha dimostrato un'associazione statisticamente significativa con PFS e OS, mentre la risposta radiologica si è dimostrata staticamente associata ad una miglior sopravvivenza. Di seguito le tabelle relative alle analisi univariate per la PFS e l'OS sulla base delle caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti.

Caratteristiche	Analisi univariate	
	HR (IC 95%)	Valore p
maschio vs femmina (10 vs 24)	0.544 (0.088- 3.346)	0.511
Eta'≤70 vs >70 (17 vs 17)	3.876 (0.433- 34.719)	0.226
Storia di fumo no vs sì (23 vs 11)	0.669 (0.109- 4.091)	0.663
Chirurgia pregressa no vs sì (28 vs 6)	31.732 (0.005- 190860.105)	0.436
Istologia adenocarcinoma vs carcinoma squamoso (32 vs 2)	22.653 (0.000- 142987007.565)	0.696
Mutazioni common no vs sì (4 vs 30)	0.68 (0.056- 14.377)	0.768
PD-L1 <1% vs ≥1% (11 vs 23)	1.008 (0.976- 1.042)	0.613
ECOG PS 0-1 vs >1 (30 vs 4)	24.966 (0.00- 2693540.276)	0.586
Stadio alla diagnosi IIIB vs IV (2 vs 32)	0.044 (0.000- 58480.316)	0.663
N° di metastasi alla diagnosi <3 vs ≥3 (28 vs 6)	0.736 (0.081- 6.647)	0.785
metastasi cerebrali no vs sì (31 vs 3)	22.894 (0.000- 76175282.483)	0.683
metastasi epatiche no vs sì (31 vs 3)	0.209 (0.019- 2.320)	0.203
metastasi ossee no vs sì (17 vs 17)	0.576 (0.096- 3.462)	0.547

ORR stabilità o progressione vs risposta parziale (10 vs 24)	11.077 (1.222- 100.403)	0.032
---	----------------------------	-------

Tabella X. Analisi univariata della PFS: caratteristiche cliniche e patologiche dei pazienti con relative frequenze, hazard ratio con intervallo di confidenza al 95% ed indice di significatività statistica.

Caratteristiche	Analisi univariate	
	HR (IC 95%)	Valore p
maschio vs femmina (10 vs 24)	0.655 (0.143- 2.989)	0.585
Eta' ≤70 vs >70 (17 vs 17)	0.905 (0.182- 4.499)	0.903
Storia di fumo no vs si (23 vs 11)	1.011 (0.184- 5.544)	0.990
Chirurgia pregressa no vs si (28 vs 6)	30.175 (0.008- 113943.610)	0.418
Istologia adenocarcinoma vs carcinoma squamoso (32 vs 2)	22.382 (0.000- 48746560.967)	0.676
Mutazioni common no vs si (4 vs 30)	0.655 (0.042- 10.522)	0.526
PD-L1 <1% vs ≥1% (11 vs 23)	1.006 (0.973- 1.041)	0.724
ECOG PS 0-1 vs >1 (30 vs 4)	24.534 (0.000- 1325891.925)	0.565
Stadio alla diagnosi IIIB vs IV (2 vs 32)	0.044 (0.000- 24707.026)	0.644

N° di metastasi alla diagnosi <3 vs ≥3	1.574 (0.172-14.396)	0.688
(28 vs 6)		
metastasi cerebrali no vs sì	37.932 (0.002-940549.769)	0.481
(31 vs 3)		
metastasi epatiche no vs sì	0.319 (0.033-3.078)	0.323
(31 vs 3)		
metastasi ossee no vs sì	0.964 (0.194-4.783)	0.964
(17 vs 17)		
ORR stabilità o progressione vs risposta parziale	13.620 (1.583-117.151)	0.017
(10 vs 24)		

Tabella XI. Analisi univariata della OS: caratteristiche cliniche e patologiche dei pazienti con relative frequenze, hazard ratio con intervallo di confidenza al 95% ed indice di significatività statistica.

4.3 BIOPSIA LIQUIDA

4.3.1 CONCORDANZA TRA BIOPSIA TISSUTALE E BIOPSIA LIQUIDA

Nei 34 pazienti arruolati nello studio l'EGFR ISQ al T0 è stato disponibile per tutti i pazienti e nessun caso è andato perso. Dall'analisi real-time PCR eseguita tramite CE IVS Cobas EGFR Mutation Test v2, si è riscontrato che otto pazienti (23,5%) presentavano un EGFR ISQ al T0 non rilevabile. Tale risultato potrebbe essere legato a diversi fattori: sensibilità intrinseca del test utilizzato, scarso DNA circolante (potenzialmente correlato al basso carico di malattia) o tipologia di mutazione (possibilmente più difficile da rilevare). Pertanto la concordanza tra biopsia standard tissutale diagnostica e biopsia liquida da protocollo di studio al basale è risultata essere pari al 76,5% (IC 95%: 58.9-89.3) e l'EGFR ISQ al T0 era quindi rilevabile per 26 pazienti.

4.3.2 CORRELAZIONE DEI RISULTATI DELLA BIOPSIA LIQUIDA CON IL CARICO DI MALATTIA

Per la correlazione dell'esito della biopsia liquida con il carico di malattia è stato considerato come parametro il numero di sedi metastatiche. Nella popolazione in studio sei pazienti su 34 (17,6%) presentavano 3 o più metastasi alla diagnosi e in tali pazienti si è riscontrato un EGFR ISQ al T0 più alto rispetto ai 28 pazienti con meno di 3 metastasi alla diagnosi (82,4%). Un carico tumorale più elevato (definito come la presenza di tre o più siti metastatici alla diagnosi) è stato correlato con un più alto ISQ al T0 (OR 3.12, IC 95%: 2.70-12.8, $p=0.004$).

4.3.3 VALUTAZIONE DINAMICA NEL PLASMA DELLA PRESENZA DI MUTAZIONE

Considerando nel dettaglio le diverse mutazioni di EGFR riscontrate al T0, al T1, al T2 e al T3, si ottiene la tabella sottostante (tabella IX).

TIPOLOGIA MUTAZIONE EGFR	T0		T1		T2		T3	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
NON ESEGUITA	0	0	0	0	2	5,88	31	91,17
NO MUTAZIONE	8	23,53	20	58,82	23	67,64	0	0
Del ex19	16	47	9	26,47	6	17,64	0	0
L858R	8	23,58	3	8,82	2	5,88	1	2,94
L861Q, G719X	1	2,94	1	2,94	1	2,94	1	2,94
T790M, L858R	1	2,94	1	2,94	0	0	1	2,94

Tabella IX. Mutazioni di EGFR rilevate nei vari time-points.

Alla biopsia liquida effettuata al T0, i pazienti in cui non si è rilevata la presenza di uno stato mutazionale di EGFR sono stati 8 (23,53%), mentre quelli con positività alla mutazione di EGFR sono risultati essere 26 (76,5%). Al T1 i pazienti senza mutazione di EGFR alla biopsia liquida sono risultati essere 20 (58,82%), mentre quelli con la mutazione 14 (41,17%). Di conseguenza tra i 26 pazienti aventi la mutazione al T0 si è ottenuto come risultato che la T1 clearance ha riguardato 12 pazienti (25,29%), mentre quelli che hanno mantenuto l'assetto mutazionale di EGFR sono stati 14 (41,17%). Per quanto riguarda i risultati alla biopsia liquida eseguita al T2, si è visto che i pazienti senza mutazione sono risultati essere 23 (67,64%), in due pazienti la mutazione non è stata ricercata (5,88%) e 9 sono risultati positivi alla mutazione di EGFR (26,47%). Infine alla biopsia liquida effettuata nei pazienti in progressione radiologica al T3, tutti hanno mantenuto il loro assetto mutazionale.

Per mostrare un quadro più chiaro del tasso mutazionale dei pazienti seguiti nel tempo, viene presentato il grafico sottostante relativo al numero di pazienti negativi e positivi per ogni time-point (figura 7).

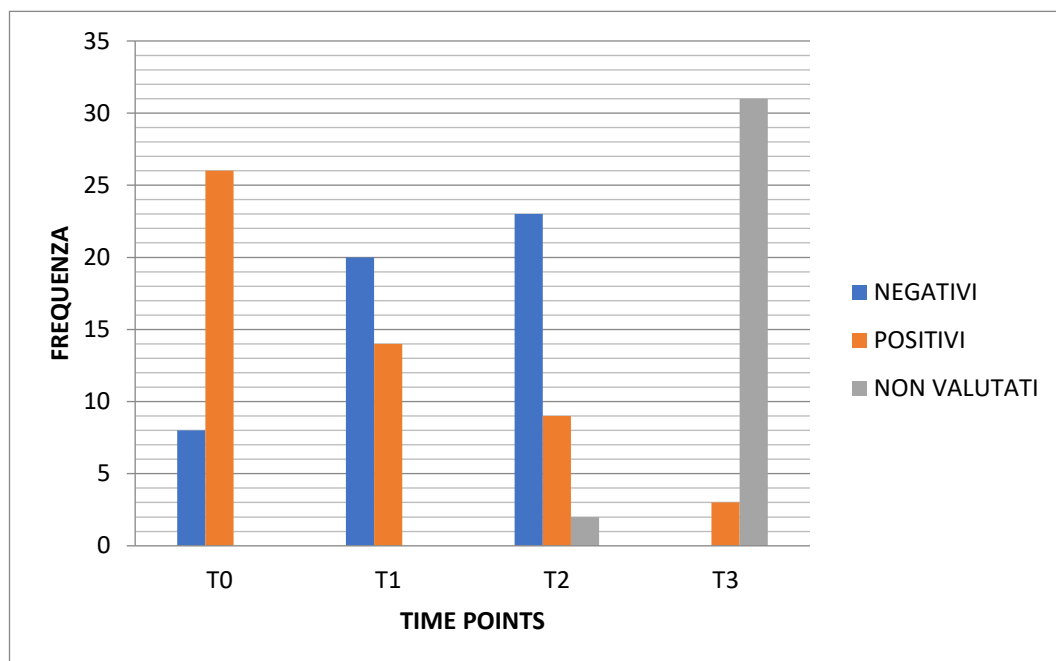


Figura 7. Numero di pazienti positivi e negativi ai vari time-points.

4.3.4 ASSOCIAZIONE TRA BIOPSIA LIQUIDA E RISPOSTA RADIOLOGICA

Nella popolazione in studio tra i 24 pazienti (70,5%) con PR come miglior risposta radiologica, 21 (61%) hanno presentato un EGFR ISQ negativo al T2 (clearance), mentre i tre restanti pazienti (8,8%) hanno avuto un EGFR ISQ positivo al T2. Tra i sette pazienti (20,5%) con SD come miglior risposta radiologica, cinque pazienti (14,7%) hanno presentato EGFR ISQ negativo al T2, mentre i restanti due pazienti (5,8%) hanno avuto un EGFR ISQ positivo al T2. Nei due pazienti (5,8%) in cui c'è stata PD come miglior risposta radiologica al trattamento, in un paziente si è riscontrata una riduzione dell'EGFR ISQ al T2 rispetto al basale inferiore al 50% e nell'altro paziente c'è stato un aumento dell'EGFR ISQ al T2 rispetto al T0. Dei pazienti che sono andati incontro a progressione radiologica e che quindi hanno eseguito il prelievo al T3, nessuno ha mostrato clearance mutazionale. È stata dimostrata una correlazione tra cambiamento dell'EGFR ISQ e tasso di risposta:

una diminuzione dell'ISQ di EGFR al T2 rispetto al T0 ($T0-T2 \geq 50\%$) è stata associata ad una probabilità maggiore di raggiungere la risposta al trattamento (OR: 13.5, IC 95%: 1.1-165.9, $p=0.042$).

4.3.5 COMPORTAMENTO BIOLOGICO E CLINICO DELLE MUTAZIONI UNCOMMON E DELLE DOPPIE MUTAZIONI

Nella nostra popolazione di studio sono state riscontrate due mutazioni non comuni (la sostituzione L861Q e l'inserzione dell'esone 20) e due mutazioni composte (le sostituzioni L861Q e G719X e le sostituzioni L858R e T790M). Il paziente con la sostituzione L861Q e la sostituzione G719X al T0 ha manifestato PD come miglior risposta radiologica e non ha avuto la clearance mutazionale dopo l'inizio del trattamento con osimertinib. L'altro paziente con mutazione composta (L858R-T790M) al T0 ha manifestato SD come miglior risposta radiologica ed è poi andato incontro a progressione clinica e radiologica di malattia dopo 50 settimane dall'inizio del trattamento. Dal punto di vista dell'andamento della biopsia liquida, al T2 si è negativizzato per la sola mutazione T790M, per poi ripresentare nuovamente la doppia mutazione L858R-T790M al T3, con un T3 ISQ dell'EGFR aumentato di molto rispetto ai tempi precedenti per entrambe le mutazioni. Il paziente con inserzione dell'esone 20 è andato incontro a progressione di malattia, ma l'ISQ dell'EGFR relativo a questo paziente non è stato rilevato nei vari time-point previsti dallo studio, mentre il paziente con singola sostituzione L861Q non ha presentato progressione di malattia.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La disponibilità di farmaci a bersaglio molecolare ha permesso di migliorare in maniera significativa l'outcome dei pazienti con alterazioni definite driver.

Tutti i pazienti però sviluppano inevitabilmente una resistenza acquisita a questi trattamenti, per cui lo studio dei meccanismi di resistenza acquisita è uno degli aspetti cruciali della ricerca traslazionale nell'ambito delle neoplasie polmonari.

Nell'ambito delle neoplasie EGFR mutate inoltre, mentre lo standard di trattamento attuale in prima linea è rappresentato da osimertinib, si affacciano diversi studi che propongono combinazioni di trattamento, tra cui la più promettente sembra essere la combinazione di chemioterapia e osimertinib in prima linea. In questo contesto, è stato disegnato uno studio prospettivo che valuta l'utilizzo della biopsia liquida per la ricerca dei meccanismi di resistenza acquisita e per il monitoraggio dinamico della mutazione nel plasma. Quest'ultimo aspetto nasce dall'ipotesi che variazioni nel plasma possano predire precocemente dopo l'inizio del trattamento la risposta radiologica e la durata del beneficio clinico. La presente tesi di laurea si focalizza su questo aspetto, descrivendo il primo gruppo di pazienti arruolati (N:34) dal punto di vista clinico, delle risposte e tolleranza ai trattamenti e della caratterizzazione molecolare su tessuto e plasma. Dal punto di vista della risposta al trattamento, abbiamo riscontrato due pazienti (5,9%) con una PD come risposta radiologica migliore. Nello studio registrativo FLAURA che confrontava osimertinib a gefitinib o erlotinib in pazienti con mutazioni classiche di EGFR (delezione dell'esone 19 e sostituzione L858R dell'esone 21) in prima linea, il tasso di PD come miglior risposta radiologica era del 22% a sei mesi⁸¹. Nell'analizzare i nostri dati di attività, è essenziale tener conto di due aspetti. Il primo riguarda la differenza tra la popolazione degli studi clinici interventistici, selezionata per criteri clinici stringenti, e la popolazione della pratica clinica, definita "real-world". Nel nostro studio quindi i criteri di inclusione erano meno stringenti, senza la presenza di una selezione clinica che ritroviamo invece in studi clinici interventistici come il FLAURA⁸¹.

Il secondo aspetto riguarda l'eterogeneità delle mutazioni di EGFR e il loro relativo profilo di sensibilità. In particolare le mutazioni comuni, delezione del 19 e L858R dell'esone 21, sono associate ad una sensibilità maggiore al trattamento con TKI, mentre le mutazioni più rare presentano una sensibilità piuttosto eterogenea e generalmente inferiore. Tra i pazienti arruolati, il 12% è risultato avere mutazioni non comuni di EGFR: due mutazioni composte, una inserzione dell'esone 20 e una mutazione L861Q di EGFR. Nello studio FLAURA erano invece includibili solo i pazienti con delezione del 19 o mutazione L858R⁸¹. Nei due pazienti con mutazione composta si è riscontrata progressione come miglior risposta radiologica, così come nel paziente con inserzione dell'esone 20 di EGFR, a conferma dei dati di letteratura riguardo all'eterogeneità delle mutazioni rare di EGFR⁹⁵. L'efficacia di osimertinib in presenza di mutazioni non comuni di EGFR è stata valutata in maniera prospettica nello studio UNICORN, nel quale i pazienti inclusi presentavano NSCLC avanzato con mutazioni di EGFR non comuni, incluse delezioni atipiche dell'esone 19 ed escluse le inserzioni dell'esone 20. Nel caso della mutazione L861Q, l'ORR al trattamento è stato pari al 78% e la PFS mediana è risultata essere pari a 15,7 mesi⁹⁵, coerentemente con quanto riscontrato nella nostra casistica, nella quale il paziente con mutazione L861Q ha dimostrato risposta radiologica ed al momento il beneficio clinico persiste.

L'analisi riguardante la tossicità del trattamento, ha confermato una buona maneggevolezza del farmaco nella pratica clinica. Come noto, le tossicità più frequentemente riscontrate sono state: diarrea e rash cutaneo e gli effetti sono stati generalmente di grado lieve o moderato. In questo caso, sono stati quindi confermati nella pratica clinica, i dati dello studio registrativo⁸¹. La valutazione mediante biopsia liquida al basale ha permesso di evidenziare una concordanza tra riscontro della mutazione su plasma e tessuto del 76,5% (IC 95%: 58.9-84.9), in linea con altri studi, come quello di Behel V. et al in cui è risultata pari al 75,4% e lo studio di Marchetti A. et al in cui è stata pari al 74%^{93,96}. Inoltre, è stato evidenziato come pazienti con almeno tre sedi metastatiche avessero una maggior probabilità di essere positivi su plasma al basale per la presenza di mutazione di EGFR, confermando così i dati di letteratura sul ruolo della biopsia liquida come possibile surrogato della valutazione del carico di malattia⁹⁷.

L'aspetto più rilevante del lavoro di tesi riguarda l'analisi delle variazioni dinamiche su plasma della mutazione di EGFR. Tra i 26 pazienti di cui era disponibile l'ISQ dell'EGFR al T0, la clearance della mutazione è stata riscontrata in 12 casi (46,15%) dopo 10 gg di trattamento (T1) e in 17 casi (65,38%) dopo 28 gg (T2). In tutti, eccetto uno (portatore di inserzione del 20) era invece riscontrabile la mutazione alla progressione. Tali aspetti descrittivi confermano il possibile ruolo della biopsia liquida e della ricerca di singole mutazioni nel plasma come surrogato del carico di malattia e dell'analisi delle variazioni biologiche nella neoplasia, come già ipotizzato del gruppo di ricerca dello IOV in altri contesti clinici, come i pazienti con mutazione di KRAS e i pazienti trattati con immunoterapia ^{92,98,99}.

Nonostante il numero relativamente limitato di casi, abbiamo riscontrato inoltre un'associazione statisticamente significativa tra riduzione di ISQ e risposta radiologica. In particolare è risultato che una diminuzione dell'ISQ di EGFR al T2 rispetto al basale maggiore o uguale del 50% fosse associata ad una maggiore probabilità di risposta al trattamento. Questo ci porta ad ipotizzare come la riduzione della quantità di cfDNA EGFR mutato presente nel campione plasmatico durante il trattamento di prima linea con osimertinib possa essere correlata ad un miglior outcome del paziente. Tale ipotesi è coerente con i dati di letteratura disponibili in materia, che dimostrano come la clearance di EGFR sia associata ad un outcome migliore in termini di OS e PFS. Nello studio di Vichitra Behel et al viene illustrato come i pazienti in cui si rileva mutazione di EGFR alla biopsia liquida 8-20 settimane dopo l'inizio del trattamento di prima linea con TKI anti-EGFR presentano un outcome peggiore rispetto a quelli in cui la mutazione non viene rilevata ⁹⁶. Nello studio di Tseng et al è stato analizzato il ruolo della valutazione dinamica della mutazione di EGFR sul plasma nel prevedere gli esiti del trattamento con TKIs, riscontrando che la persistenza delle mutazioni di EGFR nel plasma post-trattamento era associata a PFS e OS più brevi¹⁰⁰.

I maggiori punti di forza del nostro studio sono la natura prospettica dello stesso e l'analisi di pazienti trattati secondo pratica clinica. Attualmente i maggiori limiti sono legati alla numerosità al momento limitata e al follow-up ancora breve che non ci permette di correlare la variazione della mutazione su plasma con la durata

del beneficio clinico. Le prospettive future dello studio comprendono il completamento della numerosità prevista (N:100), la prosecuzione del follow-up e l'integrazione dei risultati con l'analisi delle alterazioni molecolari mediante NGS su sangue e tessuto per valutare il possibile ruolo della presenza di eventuali altre alterazioni molecolari sul nostro modello predittivo. Se tali dati venissero confermati, l'analisi della biopsia liquida eseguita precocemente durante il trattamento potrebbe essere utilizzata in uno studio interventistico come criterio di scelta per selezionare i pazienti che necessitano di un trattamento di prima linea più intensivo, come la combinazione di chemioterapia e osimertinib.

6. BIBLIOGRAFIA

1. *I Numeri del Cancro 2021; AIOM, AIRTUM.*
2. *Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA A Cancer J Clin. maggio 2021;71(3):209–49.*
3. *Toh CK, Gao F, Lim WT, Leong SS, Fong KW, Yap SP, et al. Never-smokers with lung cancer: epidemiologic evidence of a distinct disease entity. J Clin Oncol. 2006;24(15):2245-51.*
4. *J. Lortet-Tieulent et al., “Convergence of decreasing male and increasing female incidence rates in major tobacco-related cancers in Europe in 1988- 2010,” European Journal of Cancer, vol. 51, no. 9, 2015, doi: 10.1016/j.ejca.2013.10.014.*
5. *Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394-424.*
6. *Linee Guida Neoplasie del Polmone 2021; AIOM.*
7. *Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M. Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002. Jama. 2005;294(10):1255-9.*
8. *Passiglia F, Calandri M, Guerrera F, Malapelle U, Mangone L, Ramella S, et al. Lung Cancer in Italy. Journal of Thoracic Oncology. dicembre 2019;14(12):2046–52.*
9. *Vineis P, Hoek G, Krzyzanowski M, Vigna-Taglianti F, Veglia F, Airoidi L, et al. Air pollution and risk of lung cancer in a prospective study in Europe. Int J Cancer. 2006;119(1):169-74.*
10. *Liaw YP, Ting TF, Ho CC, Chiou ZY. Cell type specificity of lung cancer associated with nitric oxide. Sci Total Environ. 2010;408(21):4931-4.*
11. *Julie A, Barta, Charles A. Powell and Juan P. Wisnivesky; Global Epidemiology of Lung Cancer; Global Health; Art.8; 1-16; 2019.*
12. *Rugarli C., Cappelli G., Cappellini M. D., Cavallo Perin P., Corazza G. R., Carxì A., Crea F., Fabbri L., Ferraccioli G., Giustina A., Lazzarin A., Nuti R., Sabbadini M.G., Stella A. P.; Rugarli, Medicina Interna Sistemica; Vol.1; VII edizione; Edizioni Edra; 1003-1013; 2015.*
13. *Bade BC, Dela Cruz CS. Lung Cancer 2020. Clinics in Chest Medicine. marzo 2020;41(1):1–24.*
14. *Corrales L, Rosell R, Cardona AF, Martín C, Zatarain-Barrón ZL, Arrieta O. Lung cancer in never smokers: The role of different risk factors other than 86 tobacco smoking. Critical Reviews in Oncology/Hematology. aprile 2020;148:102895. .*
15. *Miron O, Afrasanie VA, Paduraru MI, Trandafir LM, Miron L. The relationship between chronic lung diseases and lung cancer - a narrative review. J BUON. agosto 2020;25(4):1687–92.*
16. *Ministro della salute. Gazzetta Ufficiale-DECRETO 8 novembre 2021: Individuazione dei centri che costituiscono la «Rete italiana screening polmonare» e dei criteri e delle modalità di riparto fra le regioni e le provincie autonome della spesa da destinare ai centri stessi. 2021.*

17. *Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. European Society for Medical Oncology. 2020;71.*
18. *Spiro SG, Gould MK, Colice GL, American College of Chest Physicians. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest. settembre 2007;132(3 Suppl):149S-160S. .*
19. *Buccheri G, Ferrigno D. Lung cancer: Clinical presentation and specialist referral time. European Respiratory Journal. 2004;24(6):898-904.*
20. *Jameson JL, curatore. Harrison's principles of internal medicine. Twentieth edition. New York: McGraw-Hill Education; 2018. 2 pag. 8.*
21. *Lynn D. Wilson, Frank C. Detterbeck, Joachim Yahalom; Superior vena cava syndrome with malignant causes; N Engl J Med; Vol.356; 1862-1869; 2007.*
22. *Thimothy J Martin; Horner syndrome: a clinical review; ACS Chemical Neuroscience; Vol.9; 177-186; 2018 .*
23. *Alessandro Marra; Modern management of Pancoast Tumor; Zentralbl Chir; Vol.143 No3; 316-330; 2018 91 .*
24. *Achrol AS, Rennert RC, Anders C, Soffietti R, Ahluwalia MS, Nayak L, et al. Brain metastases. Nat Rev Dis Primers. 2019;5(1):5.*
25. *Popper HH. Progression and metastasis of lung cancer. Cancer Metastasis Rev. 2016;35(1):75-90.*
26. *Ost DE, Jim Yeung SC, Tanoue LT, Gould MK. Clinical and organizational factors in the initial evaluation of patients with lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. Chest. 2013;143(5 Suppl):e121S-e41S.*
27. *Ilias I, Torpy DJ, Pacak K, Mullen N, Wesley RA, Nieman LK. Cushing's syndrome due to ectopic corticotropin secretion: Twenty years' experience at the National Institutes of Health. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2005;90(8):4955-62.*
28. *Coggeshall J, Merrill W, Hande K, Des Prez R. Implications of hypercalcemia with respect to diagnosis and treatment of lung cancer. The American Journal of Medicine. 1986;80(2):325-8.*
29. *Lumachi F, Brunello A, Roma A, Basso U. Cancer-induced hypercalcemia. Anticancer Research. 2009;29(5):1551-5.*
30. *Kulke MH. Advances in the management of patients with carcinoid syndrome. Clin Adv Hematol Oncol. 2017;15(4):257-9.*
31. *A. Raffaele Bianco, S. de Placido, G. Tortora, P. Conte, Core curriculum oncologia clinica, 2nd ed. 2016. .*
32. *Shalles K.T., Dhirendra P.S., Jaytrillok C.; Lung cancer identification: a review on detection and classification; Cancer Metastasis Rev; Vol.39; 989-998; 2020.*
33. *D. Groheux, G. Quere, E. Blanc, C. Lemarignier, L. Vercellino, C. de MargerieMellon, P. Merlet, S. Querellou; FDG PET TC for solitary pulmonary nodule and lung cancer: literature review; Diagnostic and Interventional Imaging; Vol.97; 1003-1017; 2016 .*

34. Mohsen Farsad; *FDG PET CT in staging of lung cancer; Current Radiopharmaceuticals; Vol.13; 195-203; 2020.*
35. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. *Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2018;29 Suppl 4:iv192-iv237.*
36. Reem Nooreldeen, Horacio Bach; *Current and future development in lung cancer diagnosis; International Journal of Molecular Sciences; Vol.22; 1-18; 2021.*
37. Adams K, Shah PL, Edmonds L, Lim E. *Test performance of endobronchial ultrasound and transbronchial needle aspiration biopsy for mediastinal staging in patients with lung cancer: Systematic review and meta-analysis. Thorax. 2009;64(9):757-62.*
38. Amita Sharma, Jo-Anne O Shepard; *Lung cancer biopsies; Radiol Clin North Am; Vol.56 No3; 377-390; 2018.*
39. Zhang H, Tian S, Wang S, Liu S, Liao M. *CT-Guided Percutaneous Core Needle Biopsy in Typing and Subtyping Lung Cancer: A Comparison to Surgery. Technol Cancer Res Treat. 2022;21:15330338221086411. doi:10.1177/15330338221086411.*
40. Alix-Panabières C, Pantel K; *Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application; Cancer Discov; Vol.11 No4; 858-873; 2021 .*
41. Rusch VW, Asamura H, Watanabe H, Giroux DJ, Rami-Porta R, Goldstraw P. *The IASLC lung cancer staging project : A proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. Journal of Thoracic Oncology. 2009;4(5):568-77.*
42. Woodard GA, Jones KD, Jablons DM. *Lung Cancer Staging and Prognosis. Cancer Treat Res. 2016;170:47-75.*
43. Riihimaki M, Hemminki A, Fallah M, Thomsen H, Sundquist K, Sundquist J, et al. *Metastatic sites and survival in lung cancer. Lung Cancer. 2014;86(1):78- 84.*
44. Grootjans W, de Geus-Oei LF, Troost EG, Visser EP, Oyen WJ, Bussink J. *PET in the management of locally advanced and metastatic NSCLC. Nat Rev Clin Oncol. 2015;12(7):395-407.*
45. Kuhn MJ, Hammer GM, Swenson LC, Youssef HT, Gleason TJ. *MRI evaluation of ‘solitary’ brain metastases with triple-dose gadoteridol: comparison with contrast-enhanced CT and conventional-dose gadopentetate dimeglumine MRI studies in the same patients. Computerized Medical Imaging and Graphics. 1994;18(5):391-9.*
46. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, et al. *The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of advances since 2015. Journal of Thoracic Oncology. November 2021;S1556086421033165. 28. Gallo P, Della Rocca C, D’A.*
47. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. *The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. Journal of Thoracic Oncology. gennaio 2016;11(1):39–51.*
48. Stephan Altmayer, Nupur Verma, Martina Zaguini Francisco, Renata Fragomeni Almeida, Tan-Lucien Mohammed, Bruno Hochhegger; *Classification and imaging findings of lung neoplasms; Seminars in Roentgenology; 41-50; 2019 90 .*

49. Raphael Rubin, David S. Strayer, Emanuel Rubin; *Anatomia patologica: patologia d'organo e molecolare; Tomo 2; VI edizione; Piccin; 622-630; 2014.*
50. Caplin ME, Baudin E, Ferolla P, Filosso P, Garcia-Yuste M, Lim E, et al. *Pulmonary neuroendocrine (carcinoid) tumors: European Neuroendocrine Tumor Society expert consensus and recommendations for best practice for typical and atypical pulmonary carcinoids. Ann Oncol. 2015;26(8):1604-20.*
51. Bernhardt EB, Jalal SI. *Small Cell Lung Cancer. Cancer Treat Res. 2016;170:301-22.*
52. Govindan R, Page N, Morgensztern D, Read W, Tierney R, Vlahiotis A, et al. *Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: Analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. Journal of Clinical Oncology. 2006;24(28):4539-44.*
53. *Raccomandazioni 2020 per l'esecuzione di Test Molecolari su Biopsia Liquida in Oncologia; AIOM, SIAPEC-IAP, SIBIOC, SIF.*
54. Hu L, Ru K, Zhang L, Huang Y, Zhu X, Liu H, Zetterberg A, Cheng T, Miao W; *Fluorescence in situ hybridization (FISH): an increasingly demanded tool for biomarker research and personalized medicine; Biomark Res; Vol.2 No1; 1- 13; 2014.*
55. Pennell NA, Arcila ME, Gandara DR, West H; *Biomarker Testing for Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Real-World Issues and Tough Choices; Am Soc Clin Oncol Educ Book; Vol.39; 531-542; 2019.*
56. Katarzyna Wadowska, Iwona Bil-Lula, Lukasz Trembecki, Mariola Sliwinska-Mosson; *Title: Genetic markers in lung cancer diagnosis: a review; International Journal of Molecular Sciences; Vol.21; 1-22; 2020.*
57. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. *RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. Nature Medicine. 2012;18(3):378-81.*
58. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. *The biology and management of non-small cell lung cancer. Nature. 2018;553(7689):446-54.*
59. Harrison PT, Vyse S, Huang PH. *Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. Semin Cancer Biol. 2020;61:167-179. doi:10.1016/j.semcancer.2019.09.015.*
60. Yun CH, Mengwasser KE, Toms AV, et al. *The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(6):2070-2075. doi:10.1073/pnas.0709662105.*
61. Gendarme S, Bylicki O, Chouaid C, Guisier F. *ROS-1 Fusions in Non-Small-Cell Lung Cancer: Evidence to Date. Curr Oncol. 2022;29(2):641-658. Published 2022 Jan 28. doi:10.3390/curroncol29020057.*
62. Drilon A, Jenkins C, Iyer S, Schoenfeld A, Keddy C, Davare MA. *ROS1-dependent cancers - biology, diagnostics and therapeutics. Nat Rev Clin Oncol. 2021;18(1):35-55. doi:10.1038/s41571-020-0408-9.*
63. Leonetti A, Facchinetti F, Rossi G, Minari R, Conti A, Friboulet L, Tiseo M, Planchard D; *BRAF in non-small cell lung cancer (NSCLC): Pickaxing another brick in the wall; Cancer Treat Rev; Vol.66; 82-94; 2018 .*

64. 95. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials [published correction appears in *Lancet Oncol*. 2020 Feb;21(2):e70] .
65. Drilon A, Cappuzzo F, Ou SI, Camidge DR. Targeting MET in Lung Cancer: Will Expectations Finally Be MET?. *J Thorac Oncol*. 2017;12(1):15-26. doi:10.1016/j.jtho.2016.10.014.
66. Fois SS, Paliogiannis P, Zinellu A, Fois AG, Cossu A, Palmieri G. Molecular Epidemiology of the Main Druggable Genetic Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2):612. Published 2021 Jan 9. doi:10.3390/ijms22020612.
67. Louie AV, Palma DA, Dahele M, Rodrigues GB, Senan S. Management of early-stage non-small cell lung cancer using stereotactic ablative radiotherapy: 106 controversies, insights, and changing horizons. *Radiother Oncol*. 2015;114(2):138-47.
68. Cortés ÁA, Urquizu LC, Cubero JH. Adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer: State-of-the-art. *Translational Lung Cancer Research*. 2015;4(2):191-7.
69. Wu YL, 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. doi:10.1056/NEJMoa2027071.
70. Mielgo-Rubio X, Rojo F, Mezquita-Pérez L, Casas F, Wals A, Juan M, et al. Deep diving in the PACIFIC: Practical issues in stage III non-small cell lung cancer to avoid shipwreck. *World J Clin Oncol*. 24 novembre 2020;11(11):898–917.
71. Bonanno L, Attili I, Pavan A, Sepulcri M, Pasello G, Rea F, et al. Treatment strategies for locally advanced non-small cell lung cancer in elderly patients: Translating scientific evidence into clinical practice. *Crit Rev Oncol Hematol*. luglio 2021;163:103378.
72. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, Yokoi T, Chiappori A, Lee KH, de Wit M, Cho BC, Bourhaba M, Quantin X, Tokito T, 95 Mekhail T, Planchard D, Kim YC, Karapetis CS, Hirt S, Ostoros G, Kubota K, Gray JE, Paz-Ares L, de Castro Carpeño J, Wadsworth C, Melillo G, Jiang H, Huang Y, Dennis PA, Özgüroğlu M; PACIFIC Investigators; Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer; *N Engl J Med*; Vol.377 No20; 1919-1929; 2017.
73. Poschke I, Mougiakakos D, Kiessling R. Camouflage and sabotage: Tumor escape from the immune system. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2011;60(8):1161-71.
74. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater. *J Clin Oncol*. 1 marzo 2019;37(7):537–46.
75. Mariniello A, Novello S, Scagliotti GV, Ramalingam SS. Double immune checkpoint blockade in advanced NSCLC. *Crit Rev Oncol Hematol*. agosto 2020;152:102980.
76. Alexander M, Kim SY, Cheng H. Update 2020: Management of Non-Small Cell Lung Cancer. *Lung*. 2020;198(6):897-907. doi:10.1007/s00408-020-00407-5.
77. Harrison PT, Vyse S, Huang PH. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Semin Cancer Biol*. 2020;61:167-179. doi:10.1016/j.semcancer.2019.09.015.

78. *Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. New England Journal of Medicine. 2010;362(25):2380-8. .*
79. *Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu XQ, Wang C, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. Lancet Oncol. 2011;12(8):735-42.*
80. *Paz-Ares L, Tan EH, O'Byrne K, Zhang L, Hirsh V, Boyer M, et al. Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: Overall survival data from the phase IIb LUX-Lung 7 trial. Annals of Oncology. 2017;28(2):270-7.*
81. *Cheng Y, He Y, Li W, Zhang HL, Zhou Q, Wang B, et al. Osimertinib Versus Comparator EGFR TKI as First-Line Treatment for EGFR-Mutated Advanced NSCLC: FLAURA China, A Randomized Study. Target Oncol. marzo 2021;16(2):165–76. .*
82. *Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn MJ, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. New England Journal of Medicine. 2013;368(25):2385-94.*
83. *Hida T, Nokihara H, Kondo M, Kim YH, Azuma K, Seto T, et al. Alectinib versus crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer (JALEX): an open-label, randomised phase 3 trial. The Lancet. 2017;390(10089):29- 39.*
84. *Baba K, Goto Y. Lorlatinib as a treatment for ALK-positive lung cancer. Future Oncol. 2022;18(24):2745-2766. doi:10.2217/fon-2022-0184.*
85. *Awad MM, Katayama R, McTigue M, Liu W, Deng YL, Brooun A, et al. Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1. New England Journal of Medicine. 2013;368(25):2395-401. .*
86. *Planchard D, Besse B, Groen HJM, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. Lancet Oncol. 2016;17(7):984-993. doi:10.1016/S1470-2045(16)30146-2.*
87. *Drilon A, Oxnard GR, Tan DSW, et al. Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2020;383(9):813-824. doi:10.1056/NEJMoa2005653.*
88. *Griesinger F, Curigliano G, Thomas M, et al. Safety and efficacy of pralsetinib in RET fusion-positive non-small-cell lung cancer including as first-line therapy: update from the ARROW trial. Ann Oncol. 2022;33(11):1168-1178. doi:10.1016/j.annonc.2022.08.002.*
89. *Drilon A, Cappuzzo F, Ou SI, Camidge DR. Targeting MET in Lung Cancer: Will Expectations Finally Be MET?. J Thorac Oncol. 2017;12(1):15-26. doi:10.1016/j.jtho.2016.10.014.*
90. *Dagogo-Jack I, Moonsamy P, Gainor JF, et al. A Phase 2 Study of Capmatinib in Patients With MET-Altered Lung Cancer Previously Treated With a MET Inhibitor. J Thorac Oncol. 2021;16(5):850-859. doi:10.1016/j.jtho.2021.01.1605.*
91. *Hartmaier RJ, Markovets AA, Ahn MJ, et al. Osimertinib + Savolitinib to Overcome Acquired MET-Mediated Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor-Mutated, MET-Amplified Non-Small Cell Lung Cancer: TATTON. Cancer Discov. 2023;13(1):98-113. doi:10.1158/2159-8290.CD-22-0586 .*

92. Bonanno L, Dal Maso A, Pavan A, Zulato E, Calvetti L, Pasello G, Guarneri V, Conte P, Indraccolo S. *Liquid biopsy and non-small cell lung cancer: are we looking at the tip of the iceberg?* *Br J Cancer*. 2022 Aug;127(3):383-393. doi: 10.1038/s41416-022-01777-8. Epub 2022 Mar 9. PMID: 35264788; PMCID: PMC9345955.
93. Marchetti A, Palma JF, Felicioni L, et al. *Early Prediction of Response to Tyrosine Kinase Inhibitors by Quantification of EGFR Mutations in Plasma of NSCLC Patients*. *J Thorac Oncol*. 2015;10(10):1437-1443. doi:10.1097/JTO.0000000000000643.
94. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. *New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1)*. *European Journal of Cancer*. 2009;45(2):228-47.
95. Bar J, Peled N, Schokrpur S, et al. *UNcommon EGFR Mutations: International Case Series on Efficacy of Osimertinib in Real-Life Practice in First-Line Setting (UNICORN)*. *J Thorac Oncol*. 2023;18(2):169-180. doi:10.1016/j.jtho.2022.10.004.
96. Behel V, Chougule A, Noronha V, et al. *Clinical Utility of Liquid Biopsy (Cell-free DNA) Based EGFR Mutation Detection Post treatment Initiation as a Disease Monitoring Tool in Patients With Advanced EGFR-mutant NSCLC*. *Clin Lung Cancer*. 2022;23(5):410-418. doi:10.1016/j.clcc.2022.04.002.
97. Sacher AG, Paweletz C, Dahlberg SE, Alden RS, O'Connell A, Feeney N, et al. *Prospective validation of rapid plasma genotyping for the detection of EGFR and KRAS mutations in advanced lung cancer*. *JAMA Oncol*. 2016;2:1014. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.0173.
98. Zulato E, Attili I, Pavan A, et al. *Early assessment of KRAS mutation in cfDNA correlates with risk of progression and death in advanced non-small-cell lung cancer*. *Br J Cancer*. 2020;123(1):81-91. doi:10.1038/s41416-020-0833-7.
99. Zulato E, Del Bianco P, Nardo G, et al. *Longitudinal liquid biopsy anticipates hyperprogression and early death in advanced non-small cell lung cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors*. *Br J Cancer*. 2022;127(11):2034-2042. doi:10.1038/s41416-022-01978-1.
100. Tseng JS, Yang TY, Tsai CR, et al. *Dynamic plasma EGFR mutation status as a predictor of EGFR-TKI efficacy in patients with EGFR-mutant lung adenocarcinoma*. *J Thorac Oncol*. 2015;10:603-610.