

# Il pirosequenziamento è una metodica robusta e sensibile per l'identificazione delle mutazioni del gene EGFR nel trattamento del NSCLC

nora.sahnane@uninsubria.it

Nora Sahnane\*, Rossana Gueli\*\*, Daniela Furlan\*, Barbara Bernasconi\*, Maria Grazia Tibiletti\*, Michele Stefanoli\*, Carlo Capella\*  
\*U.O. di Anatomia Patologica, Dip. di Morfologia Umana, Università dell'Insubria e Ospedale di Circolo, Varese; \*\*U.O. di Oncologia, Ospedale di Circolo, Varese

## INTRODUZIONE E SCOPO

Le mutazioni di EGFR sono predittive della risposta alla terapia del carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC) con inibitori delle Tirosin-chinasi (TKI). Ad oggi, il metodo standard per l'identificazione di tali mutazioni è il sequenziamento diretto.

Lo scopo del lavoro è stato confrontare l'accuratezza diagnostica del pirosequenziamento rispetto al sequenziamento diretto nei test di mutazione di EGFR nel NSCLC.

## MATERIALI E METODI

Gli esoni 18, 19, 20 e 21 di EGFR sono stati analizzati con pirosequenziamento (EGFR-TKI kit, Diatech) in campioni istologici fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFIP) di NSCLC di 53 pazienti trattati con TKI indipendentemente dallo stato mutazionale del gene. L'analisi con sequenziamento diretto è stata possibile in 31 di questi campioni (BigDye Terminator, Applied Biosystems). I due metodi sono stati comparati mediante allestimento di curva standard utilizzando le linee cellulari SW620 e NCI-H1975. In 36 dei 53 campioni è stata valutata l'amplificazione di EGFR con FISH interfascica su sezioni istologiche e il dato è stato correlato con la percentuale di allele mutato ottenuta con pirosequenziamento.

## RISULTATI



L'analisi delle curve standard ha rilevato una sensibilità pari al 7.5% sia utilizzando pirosequenziamento che sequenziamento diretto. Una buona linearità si è osservata con entrambi i metodi comparando le percentuali di allele mutato attese con quelle osservate (Fig.1)

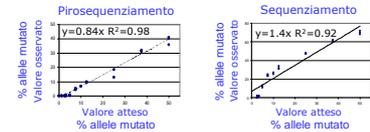


Fig.1. Linearità delle due metodiche di sequenziamento

L'analisi con pirosequenziamento ha identificato la presenza di mutazioni EGFR in 23 dei 53 casi (43%). La mutazione E747-A750del si è osservata nel 78% dei campioni, mentre le mutazioni L858R, G719C and L861Q erano raramente osservate (9%, 9% e 4% rispettivamente). Come riportato in letteratura, la presenza di mutazione si associava alla non abitudine al fumo ( $p=0.006$ ), alla sensibilità al trattamento con TKI ( $p=0.001$ ) e alla stabilizzazione di malattia ( $p=0.01$ )

Il sequenziamento diretto ha confermato l'assenza di mutazione EGFR nel 100% dei casi wild-type, mentre ha identificato la mutazione in 8 di 13 casi mutati (62%, Fig.2). Nei 5 casi discordanti, la cellularità neoplastica era inferiore al 30% e la percentuale di allele mutato rilevato con pirosequenziamento era inferiore al 15%.

		pirosequenziamento	
		MUT	WT
Sequenziamento diretto	MUT	8	0
	WT	5	15

Fig.2. Confronto tra l'identificazione dei casi con mutazione con pirosequenziamento e sequenziamento diretto.

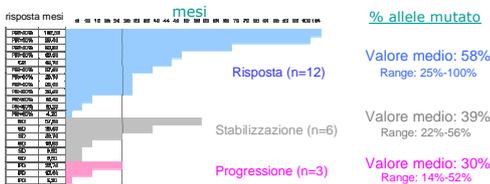


Fig.3. Correlazioni tra le percentuali di allele mutato risultanti dall'analisi con pirosequenziamento, la risposta clinica e il tempo di sopravvivenza globale dei pazienti  
PR: risposta parziale, CR: risposta completa, SD: malattia stabile, PD: progressione di malattia

L'informazione quantitativa ottenuta con pirosequenziamento ha permesso di osservare percentuali di allele mutato maggiori nei tumori di pazienti che hanno mostrato risposta completa o parziale al trattamento rispetto ai pazienti con malattia stabilizzata o in progressione (Fig.3)

L'analisi FISH ha identificato l'amplificazione di EGFR in 7 di 20 casi mutati e in un solo caso di 16 non mutati. La correlazione tra il dato quantitativo di mutazione e il dato di amplificazione genica ha permesso di osservare una buona associazione tra l'aumentato numero di copie geniche e percentuali di allele mutato superiori al 50%, suggerendo l'amplificazione preferenziale dell'allele mutato (Fig.4A)

A)

Casi amplificati	Tipo di mutazione	% allele mutato
1	E746-A750 del	100
2	E746-A750 del	90
3	E746-A750 del	85
4	E746-A750 del	69
5	L861Q	56
6	L858R/E746-A750 del	26/26
7	L858R	23

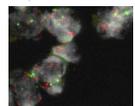


Fig.4. A) Percentuali di allele mutato nei 7 casi con amplificazione genica  
B) Esempio di amplificazione genica identificata con FISH interfascica

## CONCLUSIONI

Il pirosequenziamento consente un'elevata accuratezza diagnostica nei test di mutazione di EGFR consentendo analisi quantitative che ben correlano con la risposta al trattamento con TKI e con lo stato di amplificazione del gene.

Il pirosequenziamento, pur mostrando una sensibilità paragonabile al sequenziamento diretto in situazioni controllate come l'analisi di mutazione su DNA abbondante e ad alto peso molecolare, dimostra una detection rate superiore al sequenziamento diretto nella pratica diagnostica, in cui il tessuto tumorale in esame è prevalentemente di tipo biptico, FFIP, spesso con bassa cellularità neoplastica.