

Il ruolo dei fattori predittivi del carcinoma del colon retto nel percorso diagnostico terapeutico. Biologia molecolare ed immunoistochimica.

Sandra von Borries

SODc Istologia Patologica e Diagnostica Molecolare (AOUC)

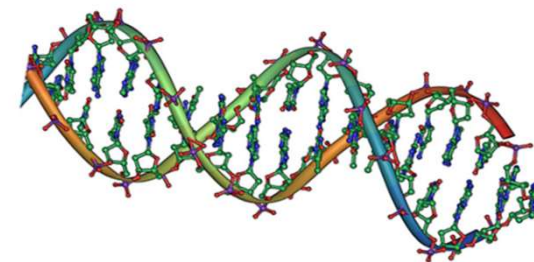
La medicina personalizzata

Le neoplasie sono generalmente causate dall'accumulo progressivo di mutazioni nelle cellule.

I geni maggiormente colpiti sono i **geni onco-soppressori** e i **proto-oncogeni**.

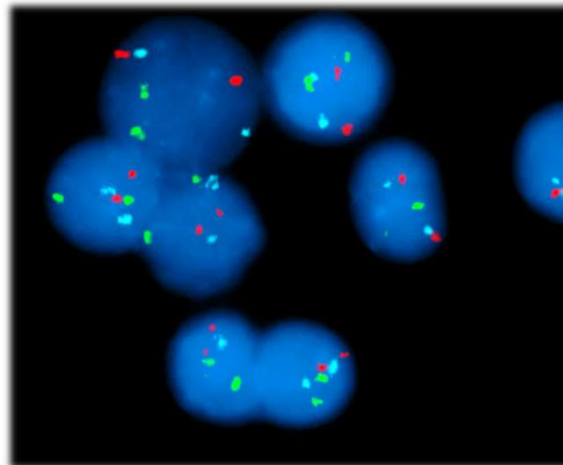
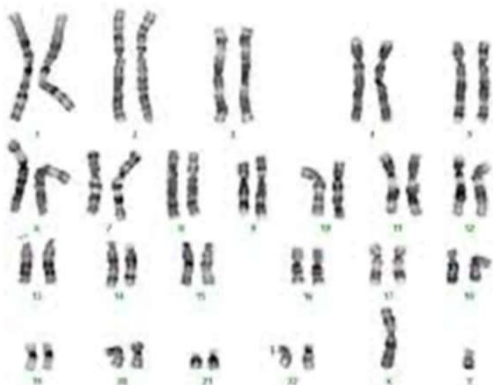
Il risultato è una crescita cellulare incontrollata, la perdita di differenziazione cellulare e l'inibizione dell'apoptosi.

Le indagini molecolari in ambito oncologico consentono di individuare specifiche alterazioni genetiche a scopo **diagnostico**, **prognostico** o **predittivo** per la risposta a farmaci-target.



Le tecniche molecolari a supporto del paziente oncologico

Negli ultimi 20 anni la comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nell'insorgenza dei tumori e lo sviluppo di nuove tecnologie nell'ambito della biologia molecolare (in particolare l'NGS) hanno rivoluzionato in maniera significativa le terapie oncologiche e hanno fornito un nuovo strumento per le diagnosi più complesse.



Le tecniche molecolari per la ricerca di alterazioni nel carcinoma del colon-retto

Real Time PCR

Utilizza specifici fluorocromi che in presenza emettono fluorescenza a una certa temperatura di melting.

Caratteristiche:

Esecuzione rapida e meno complessa rispetto a NGS

Alta sensibilità e specificità

Metodica robusta



Next Generation Sequencing (NGS)

Consente di analizzare tramite sequenziamento un numero ampio di geni per l'individuazione di mutazioni somatiche. **ESMO** (European Society For Medical Oncology) e **AIOM** (Associazione Italiana Medici Oncologi) la indicano come la metodica di elezione per lo studio mutazionale di molti tumori*.

Caratteristiche:

Pannelli genici ampi (nel colon-retto valutazione sia di mutazioni somatiche che di MSI)

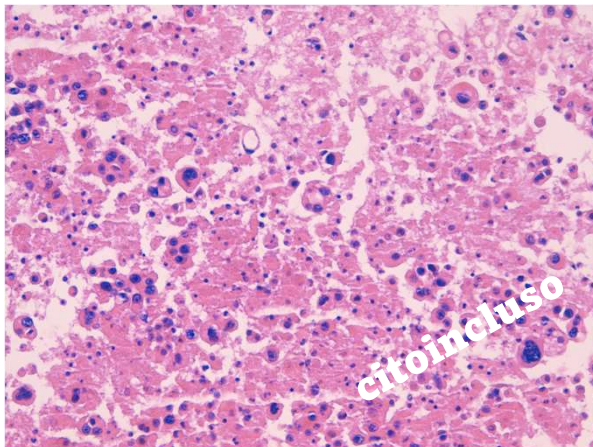
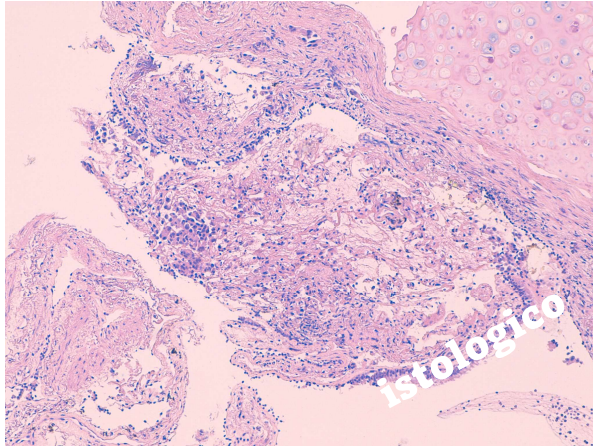
Esecuzione e analisi dei dati lunghe e articolate

Analisi dei dati complessa

E' in grado di individuare nuove varianti



*Mosele et al., 2020; Hendricks et al., 2023.



Istologici e citologici

- Tipo di campione (citologico, istologico, biopsia, pezzo operatorio)
- Quantità e qualità del campione
- Fissativo
- Infiammazione, necrosi, pigmenti
- Età del campione
- Concentrazione e frammentazione del DNA e dell'RNA

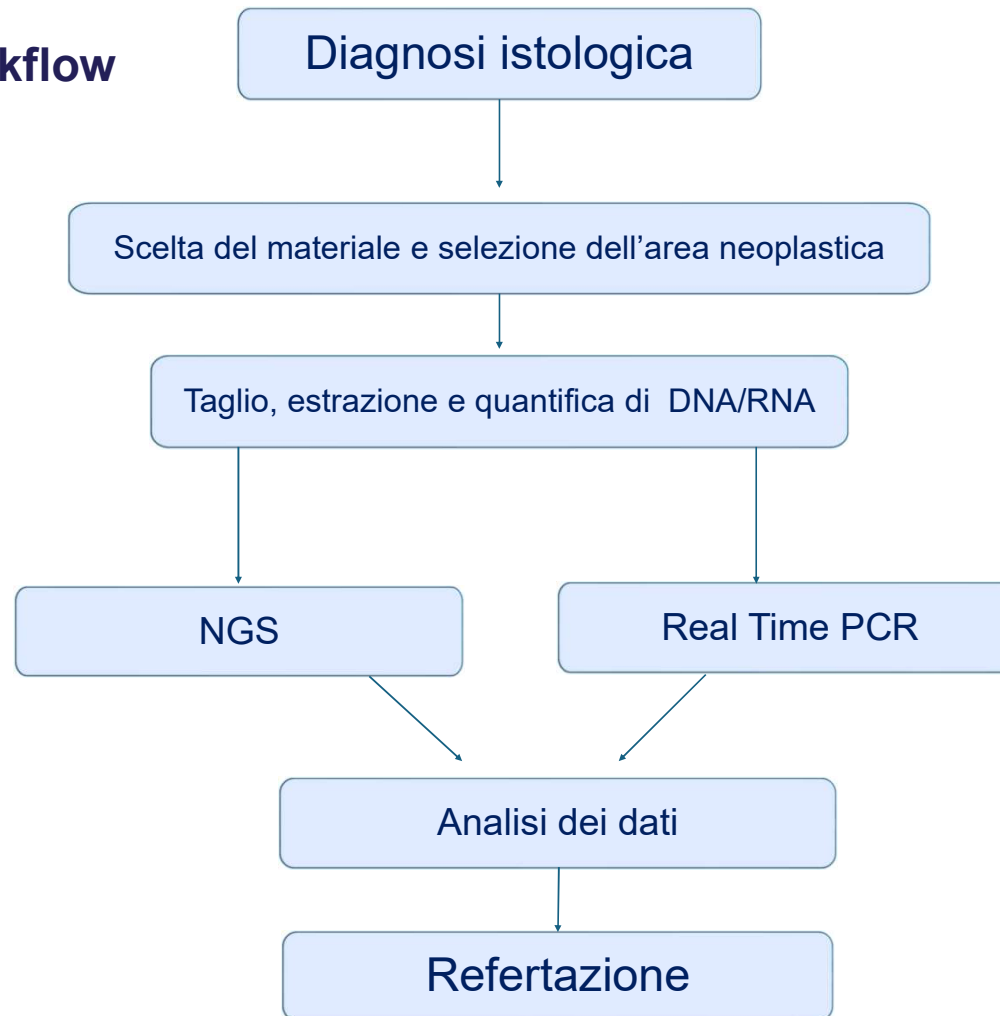
E' molto importante scegliere la tecnica molecolare più adeguata per ogni paziente. Questo dipende dalla tipologia di campione e dalle esigenze cliniche.

Real Time PCR and NGS workflow

Tempi di risposta:

Real Time PCR: 5 giorni lavorativi

NGS: 14 giorni lavorativi



I microsatelliti

I **microsatelliti** sono sequenze di DNA costituite da brevi ripetizioni nucleotidiche, che possono variare in lunghezza quando il sistema di riparo del DNA (Mismatch Repair, MMR) è difettoso → in questo caso si accumulano progressivamente mutazioni che determinano l'**instabilità microsatellitare (MSI)**.



MSS

MSI-L

MSI-H

In base all'analisi dell'instabilità dei microsatelliti, il tumore del colon-retto (CRC) può essere distinto in due diverse categorie:

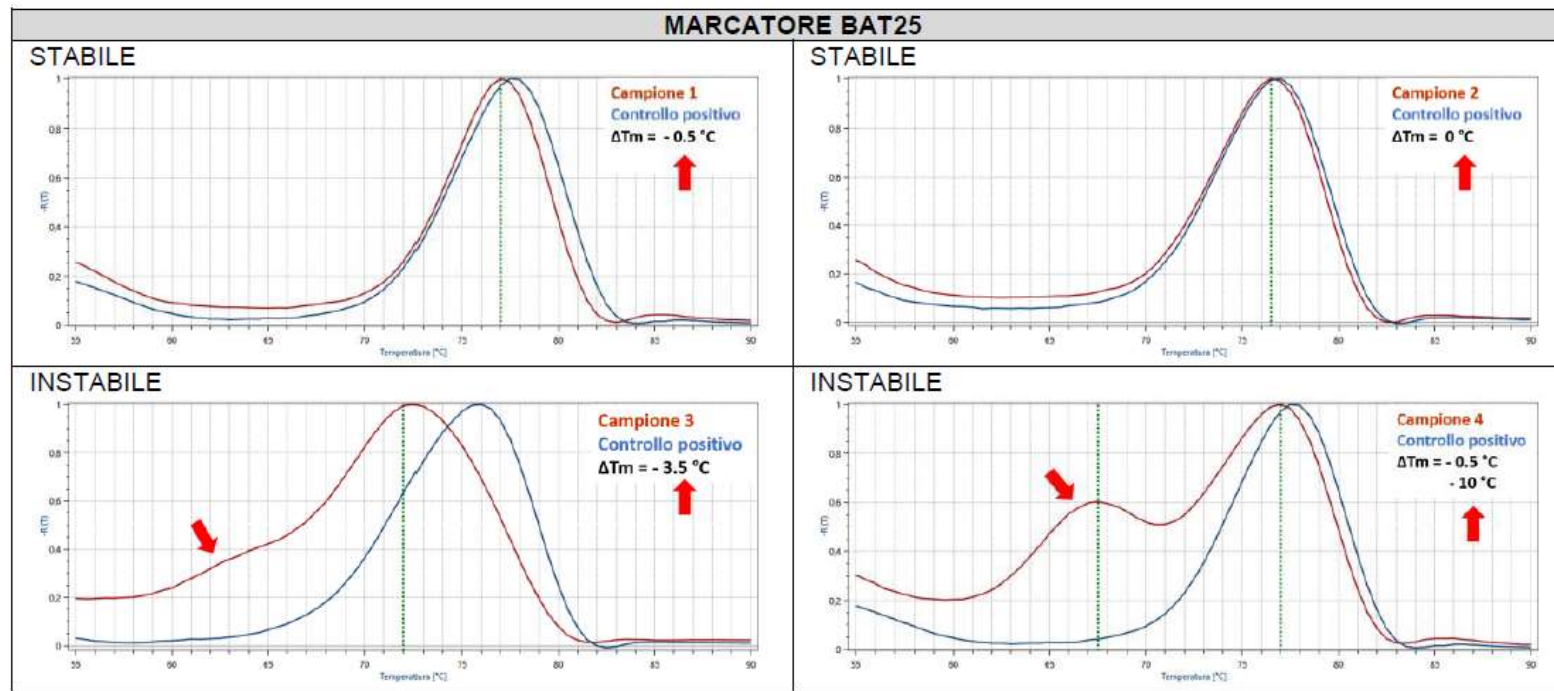
- ✓ Tumori con MMR difettivo e alti livelli di instabilità dei microsatelliti (**MSI-H**, circa il 15%). In questi tumori, il sistema di riparazione del DNA non funziona: si accumulano moltissime mutazioni, rendendo il tumore "visibile" al sistema immunitario, ma anche resistente alla chemioterapia standard.
- ✓ Tumori con MMR funzionante e con bassi livelli di instabilità (**MSI-L**, circa 85%) o stabili (**MSS**). È la forma più comune. Il DNA è "stabile", il che significa che il tumore sa nascondersi meglio dal sistema immunitario, rendendo l'immunoterapia (da sola) purtroppo inefficace.

I tumori del colon-retto MSI-H sono associati ad un tasso elevato di mutazione, infiltrazione di cellule immunitarie e prognosi migliore rispetto ai tumori con MSI basso o assente.

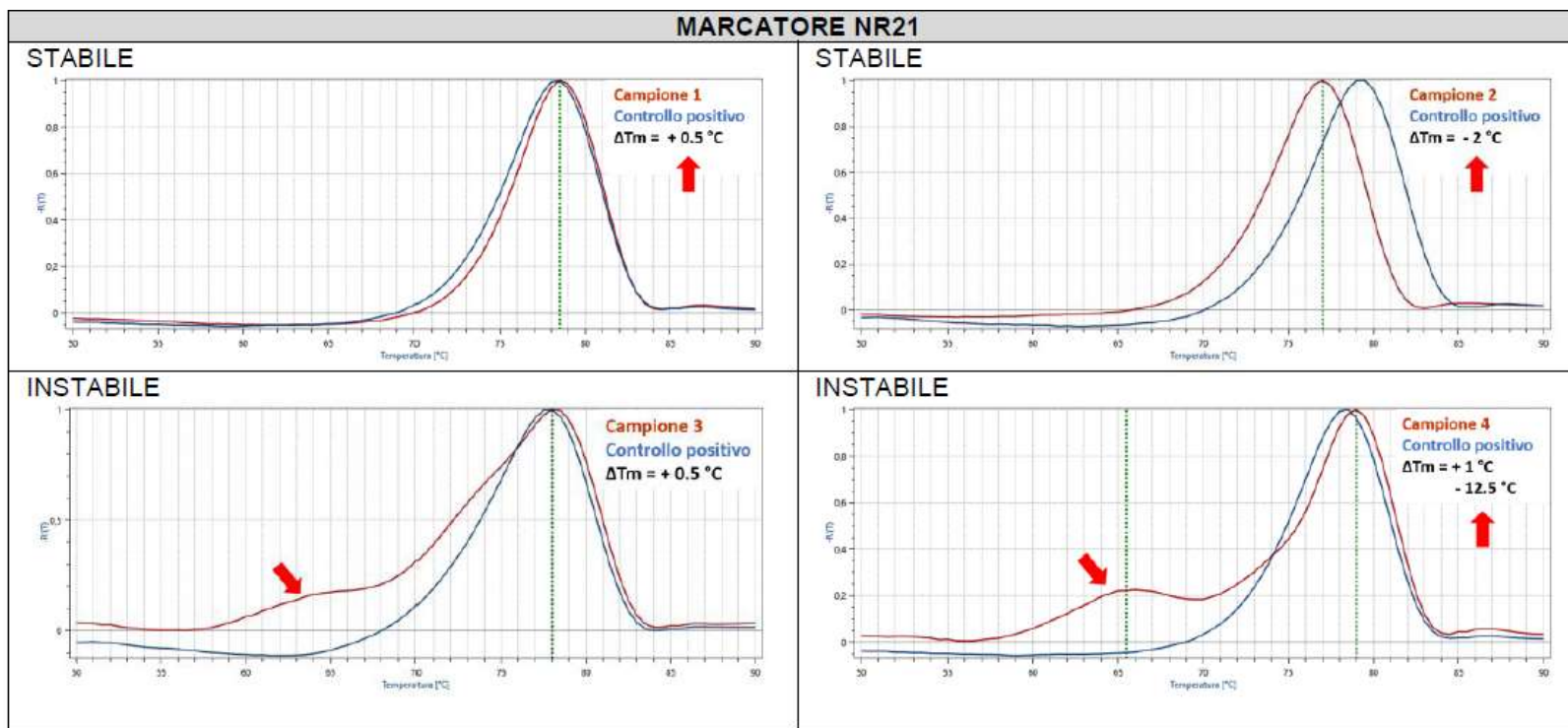
I microsatelliti del pannello Bethesda

MARCATORE	GENE	NCBI Ref. Seq. (GRCh 38.p12)	CROMOSOMA
BAT25	cKIT	NC_000004.12	4 (4q12)
BAT26	MSH2	NC_000002.12	2 (2p21-p16.3)
NR21	SLC7A8	NC_000014.9	14 (14q11.2)
NR22	STT3A	NC_000011.10	11 (11q24.2)
NR24	ZNF2	NC_000002.12	2 (2q11.1)
NR27	BIRC3	NC_000011.10	11 (11q22.2)
CAT25	CASP2	NC_000007.14	7 (7q34)
MONO27	MAP4K3	NC_000002.12	2 (2p22.1)

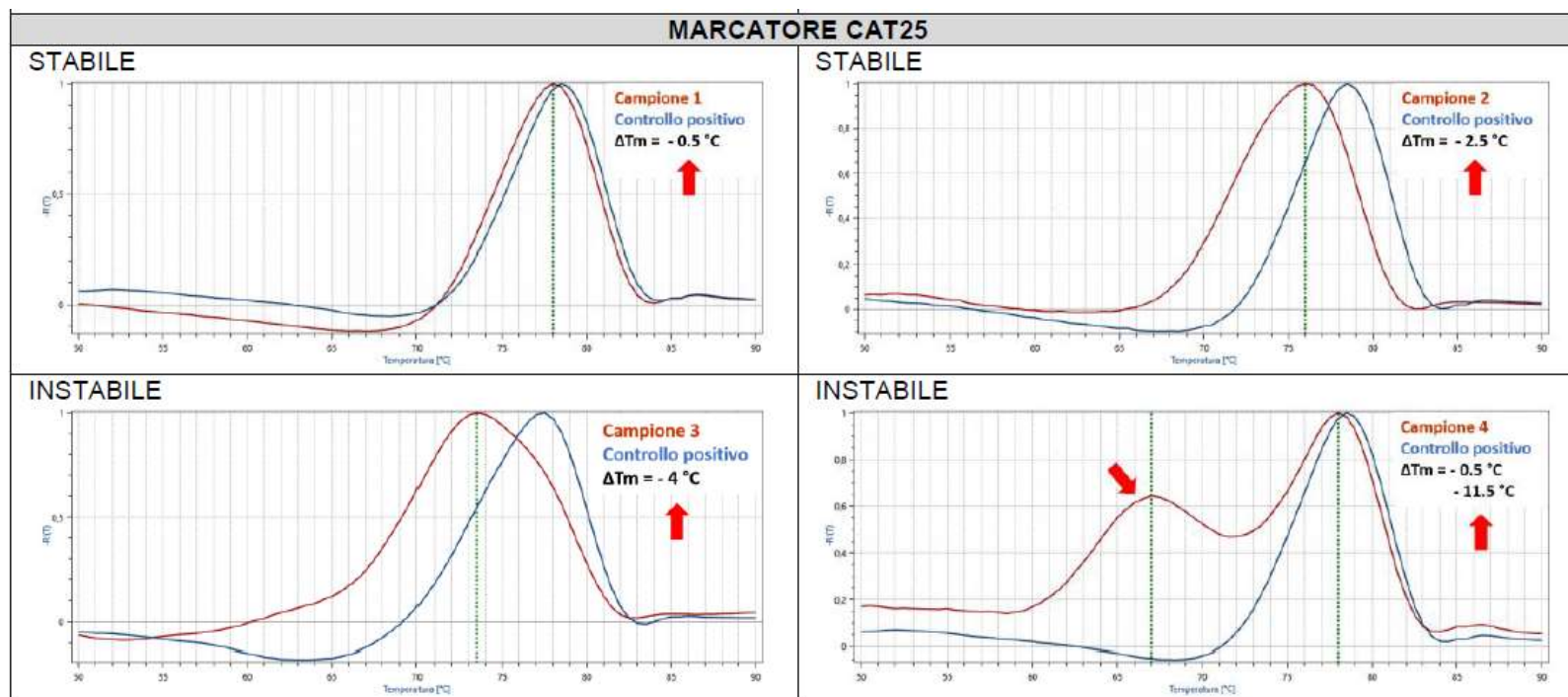
Analisi molecolare in Real Time PCR del marcatore BAT 25



Analisi molecolare in Real Time PCR del marcatore NR21



Analisi molecolare in Real Time PCR del marcatore CAT25



Pannello NGS a 50 geni

Analizza
simultaneamente
DNA ed RNA.
Si utilizza per
l'identificazione di
SNV, indels, fusioni,
amplificazioni geniche
e instabilità
microsatellitare in
geni, la cui
alterazione ha una
rilevanza clinica in
oncologia.

SNV, InsDEL

AKT1	KIT
ALK	KRAS
AR	MAP2K1 (MEK1)
BRAF	MET
CDK4	MTOR
CDKN2A	NF1
CTNNB1	NRAS
DDR2	NTRK1
EGFR	NTRK2
ERBB2	NTRK3
ERBB3	PDGFRA
ERBB4	PIK3CA
ESR1	POLE
FGFR1	PTEN
FGFR2	RAF1
FGFR3	RB1
FGFR4	RET
GNA11	ROS1
GNAQ	SMAD4
GNAS	SMO
HRAS	STK11
IDH1	TERT
IDH2	TP53
KEAP1	TSC1

Fusioni

ALK
FGFR1
FGFR2
FGFR3
MET
NRG1
NTRK1
NTRK2
NTRK3
PPARG
RET
ROS1

CNV

EGFR
ERBB2
MET

MSI

Pannello Bethesda
BAT25 (KIT)
BAT26 (MSH2)
CAT25 (CASP2)
MONO27 (MAP4K3)
NR21 (SLC7A8)
NR22 (STT3A)
NR24 (ZNF3)
NR27 (BIRC3)

In aggiunta altri 118
marcatori mononucleotidici

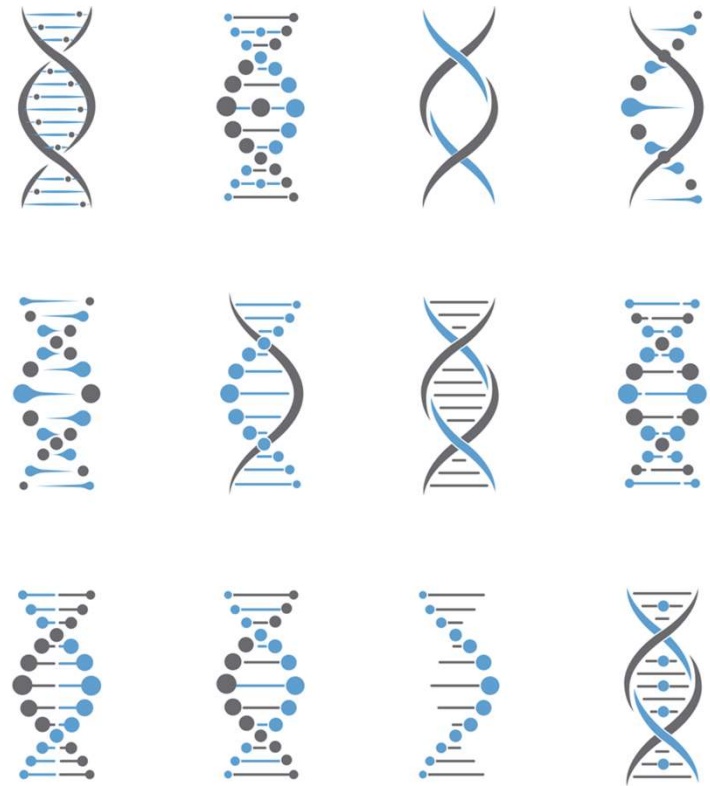
Marcatori Molecolari nel Carcinoma del Colon-Retto (CRC)

Categoria	Marcatore	Significato Clinico e Target
Terapie Standard	RAS (KRAS, NRAS)	L'assenza di mutazione (WT) è necessaria per l'uso di anti-EGFR . La mutazione G12C è target per Sotorasib.
(Predittivi)	BRAF (V600E)	Prognosi negativa; guida la terapia combinata con inibitori di BRAF; associato a MSI-H.
	PIK3CA	Associato a minore risposta agli anti-EGFR; oggetto di studi clinici.
Terapie Agnostiche	ERBB2 (HER2)	Rileva mutazioni e amplificazioni per l'accesso a terapie anti-HER2 .
ed Emergenti	MET	Amplificazioni o skipping esone 14; utile per superare le resistenze.
	NTRK 1/2/3	Fusioni rare ma azionabili con farmaci come Larotrectinib .
	AKT1 e PTEN	Coinvolti nel pathway PI3K/mTOR; utili per stratificazione in trial clinici.
Resistenza e	TP53	Mutato nel ~60% dei casi; indicatore di aggressività tumorale.
Progressione	APC	Evento iniziatore della carcinogenesi (via dei Wnt).
	FBXW7 / SMAD4	Associati a progressione rapida e resistenza ai trattamenti standard.



Le comutazioni

- Le comutazioni potrebbero influenzare la risposta alle terapie target, richiedendo farmaci diversi.
- Le comutazioni possono essere associate a una minor efficacia dei trattamenti
- Per questo è importante utilizzare ampi pannelli genici per il sequenziamento.



Sample Analysis Results

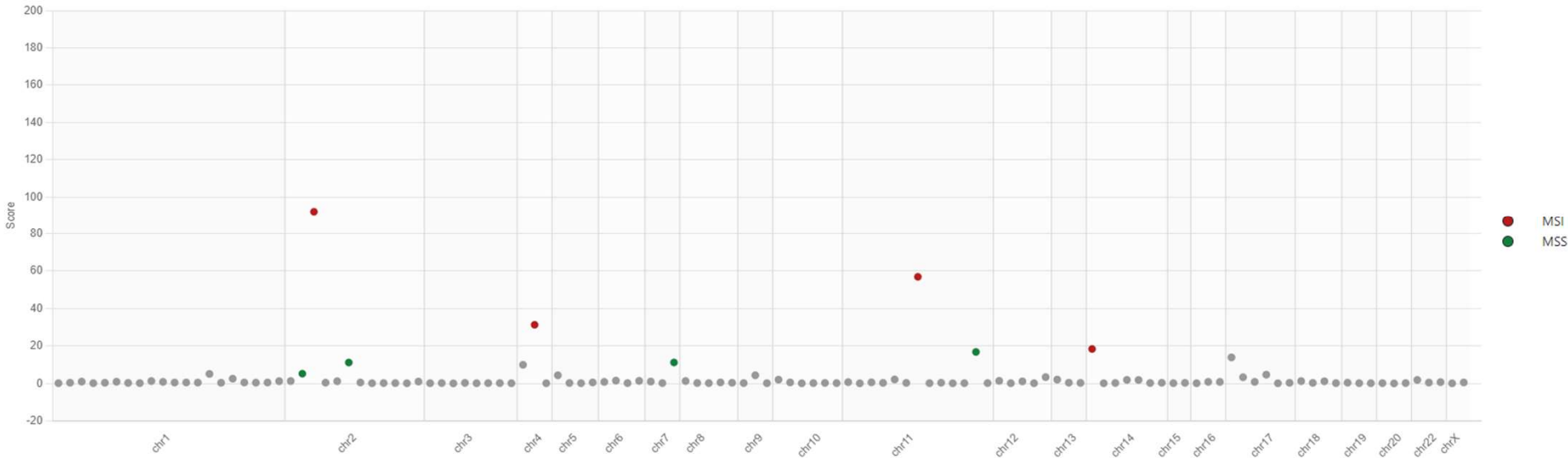
Actions	ID	Sample Name	Application	Type	Experiment Name	Conformity
	1068	25M1768_S7	NG101	Somatic	20251231_NG101_79	DNA: RNA:

- Metrics
- Confident Variants
- Low Confidence Variants
- Low Confidence Regions
- CNV
- Structural Variants
- Alk
- MSI

MicroSatellite Status

MSI-H

Details



Il referto molecolare

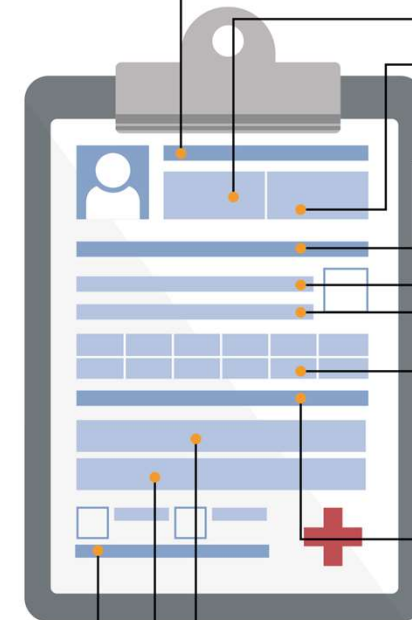
Pannelli genici NGS sempre più ampi determinano una maggiore complessità nell'analisi, nell'interpretazione dei dati molecolari e nella refertazione.

- Aggiornamento continuo del personale su nuove tecnologie, nuovi pannelli e nuovi marcatori molecolari
- Selezione delle informazioni molecolari utili al clinico
- **Necessità di linee guida nazionali e internazionali per uniformare i referti, allo scopo di facilitarne la comprensione e agevolare il confronto tra centri diversi.**



**Percorso guidato
all'elaborazione
ed interpretazione
di un referto NGS**
powered by PMMP

Modello di referto standard semplificato



Dati del Laboratorio che esegue il test
Struttura Sanitaria, Dipartimento, Reparto,
Indirizzo, Contatti, Certificazioni

Dati identificativi del paziente
Nome - Cognome - Data di nascita - Sesso

Dati Anatomopatologici
Tipo di tumore - Tipo di campione - ID Campione Sito
del prelievo - Data del prelievo - Data di ricezione -
Cellularità tumorale

Quesito clinico
Geni da testare e principali informazioni cliniche

Metodologia utilizzata
Nome del saggio NGS e piattaforma

Diagnosi
Sintesi dei risultati più rilevanti
e della loro interpretazione clinico-terapeutica

Risultati
Tabella descrittiva delle varianti genomiche rilevate
nei geni richiesti - "Genomic Signature" -
Geni richiesti non alterati

Pag.2 Altri risultati
Varianti rilevate in altri geni del pannello ed
eventuali varianti d'incerto significato (VUS)

Pag.2 Caratteristiche del saggio molecolare
Processazione del campione e descrizione del saggio NGS

Pag.2 Appendice
Banche dati, livelli, controlli di qualità, bibliografia, altro

Pag.2 Firma del clinico
Firma del Biologo Molecolare

Come si scrive una mutazione somatica*

Gene BRAF, esone 15, c.1799T>G, missense variant, p.V600E (p.Val600Glu), VAF 20.22

Classificazione: *oncogenica*.

OncoKB Levels of Evidence Actionable Genes Oncology Therapies CDx Cancer Genes API / License About News FAQ Account Missing Data Reporting

BRAF / V600E

BRAF V600E

Oncogenic • Gain-of-function • Level 1 • Level Dx2 • FDA Level 2

BRAF, an intracellular kinase, is frequently mutated in melanoma, thyroid and lung cancers among others.

The BRAF V600E mutation is known to be oncogenic.

Hide mutation effect description

The class I activating exon 15 BRAF V600E mutation is located in the kinase domain of the BRAF protein and is highly recurrent in melanoma, lung and thyroid cancer, among others (PMID: 28783779, 26099043, 25079952, 23833300, 25417714, 28783779, 12068308). This mutation has been comprehensively biologically characterized and has been shown to activate the downstream MAPK pathway independent of RAS (PMID: 15035987, 12068308, 19259501, 26343582), to render BRAF constitutively activated in monomeric form (PMID: 20179705), and to retain sensitivity to RAF monomer inhibitors such as vemurafenib and dabrafenib (PMID: 26343582, 28783779, 20179705, 30353999).

Come si riporta l'instabilità microsatellitare:

- Stabilità: MSS
- Bassa instabilità (low): MSI-L
- Alta instabilità (high): MSI-H

Indicando quali microsatelliti sono stabili e quali sono instabili



MY CANCER GENOME®
GENETICALLY INFORMED CANCER MEDICINE

Franklin
by genoox

Q BRAF V600E

SEARCH KNOWLEDGE BASE

Search Page > BRAF:c.1799T>A

BRAF:c.1799T>A

chr7-140453136 A>T | p.Val600Glu | NM_004333.6 | dbSNP, rs113488022 | UCSC, TraP, gnomAD

Classify Variant Follow Save Case Export Summary

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

ClinVar

ClinVar Search ClinVar by gene symbol

ClinVar home Advanced

Home About Access Help Submit Statistics

*Percorso guidato all'elaborazione ed interpretazione di un referto NGS (PMMP-SIAPEC, aprile 2025)

Mutazioni e instabilità microsatellitare: la refertazione del pannello 50 geni

L'analisi ha evidenziato la presenza delle seguenti mutazioni somatiche:

- **gene BRAF, esone 15, c.1799T>A, p.Val600Glu (V600E), VAF 45.10.** Classificazione: *oncogenica/drug response*
- **gene TP53, esone 8, c.844C>T, p.Arg282Trp (R282W), VAF 80.10.** Classificazione: *oncogenica*

Non sono state rilevate altre mutazioni, amplificazioni e fusioni geniche nel pannello analizzato.

Analisi dei microsatelliti: La neoplasia presenta una **stabilità (MSS)** dei microsatelliti.

BAT 25	stabile	NR 24	stabile
BAT 26	stabile	NR 27	stabile
NR 21	stabile	CAT 25	stabile
NR 22	stabile	MONO 27	stabile

Conclusioni

- Per le neoplasie del tratto gastroenterico le metodiche molecolari più utilizzate sono la Real Time PCR per l'instabilità microsatellitare e l'NGS per la ricerca di mutazioni missenso e piccole inserzioni/delezioni e per i riarrangiamenti.
- L'instabilità dei microsatelliti (MSI) è una condizione genetica di ipermutazione, causata da un malfunzionamento dei sistemi di riparazione del DNA (Mismatch Repair, MMR), utile per valutare la risposta del paziente all'immunoterapia.
- I pazienti KRAS WT rispondono alle terapie anti-EGFR (Cetuximab/Panitumumab). Alcuni marcatori possono dare indicazioni verso terapie diverse, come BRAF V600E, PIK3CA, mutazioni o amplificazioni di ERBB2 (HER2), MET 14 exon skipping, NTRK 1/2/3. Esistono, infine, marcatori di resistenza e di progressione di malattia, come la TP53 o SMAD4
- Il percorso molecolare ottimale per il paziente oncologico richiede un approccio multidisciplinare tra le diverse specialità: patologi, biologi molecolari e oncologi, oltre al fondamentale lavoro quotidiano dei TSLB.

Il laboratorio di Patologia Molecolare

Un grazie particolare a Veronica Pennati, Gabriele Pentassuglia e Margherita Navarrini





GRAZIE!