



**Psdta Tumori delle vie biliari**

## **Allegato 4 : Principali indicazioni sulla diagnosi cito/istologica e molecolare nelle neoplasie delle vie biliari**

**Gruppo di Studio Tumori del Pancreas e delle Vie Biliari**

**Rete Oncologica Piemonte e Valle d'Aosta**

**Anno di pubblicazione 2022**

# PRINCIPALI INDICAZIONI SULLA DIAGNOSI CITO/ISTOLOGICA E MOLECOLARE NELLE NEOPLASIE DELLE VIE BILIARI

A cura di Prof. Renzo Boldorini e Dr.ssa Alessia Paganotti – S.C.D.U Anatomia Patologica AOU Novara

## Selezione campione

- Il test viene eseguito su richiesta dell'oncologo medico in ottemperanza a quanto previsto dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA)
- La caratterizzazione molecolare si basa sulla valutazione delle alterazioni di vari marcatori genetici. Tale caratterizzazione può essere potenzialmente effettuata su qualsiasi tipo di campione istologico (biopsia e pezzo operatorio da tumore primitivo o metastasi) ed anche su materiale citologico (agoaspirati con o senza guida ecografica/TAC, versamenti), purché il campione contenga una quantità di cellule tumorali vitali sufficiente per l'indagine richiesta; infatti la possibilità di individuare mutazioni geniche può essere inficiata da una bassa percentuale di cellule neoplastiche nel campione in quanto alleli wild-type delle cellule non-trasformate determinano una diluizione degli alleli mutati. Se si impiegano procedure di analisi standard (quali ad es. il sequenziamento diretto), si suggerisce la presenza di almeno il 50% di cellule neoplastiche. Più difficile è indicare quale sia il minimo quantitativo di cellule tumorali per l'analisi molecolare nel caso di piccoli prelievi biotici o citologici. Il risultato dell'esame dipende oltre che dalla quantità, anche dalla qualità del materiale biologico disponibile. Come indicazione di massima, anche se si utilizzano metodiche sensibili per l'analisi mutazionale, è preferibile non procedere all'analisi se non sono presenti almeno 100 cellule neoplastiche nel campione.
- Quando si dispone soltanto di materiale biotico e/o citologico risulta di particolare rilevanza che il medico Patologo si faccia carico della gestione dei campioni disponibili. Pertanto, è cruciale che i vari biomateriali di un paziente siano valutati contestualmente e in modo integrato, per evitare il rapido esaurimento del materiale tissutale/cellulare e riuscire a fornire sia una caratterizzazione morfologica, sia informazioni su tutti i biomarcatori predittivi necessari. Per tale motivo, potrebbe essere opportuno utilizzare per analisi su DNA gli strisci convenzionali, se ricchi di componente cellulare neoplastica vitale, preservando il materiale istologico e i citoinclusi per caratterizzazioni che richiedano indagini immunofenotipiche (es. MMR). Pertanto, il medico Patologo effettua un accurato esame microscopico del tessuto prelevato e provvede a selezionare le aree tumorali che verranno poi sottoposte a macro-dissezione, al fine di arricchire di cellule neoplastiche il preparato che sarà sottoposto ad analisi. Fortemente consigliato valutare il contenuto tumorale su sezioni colorate con Ematossilina-Eosina ottenute dall'inclusione scelta, prima e dopo avere fatto eseguire le sezioni da cui estrarre il DNA. I risultati di tale attività devono essere registrati e riportati nel referto. Inoltre se nel pezzo operatorio/citologico residuano rare cellule neoplastiche possono essere adottate metodiche ad alta sensibilità previa cattura delle cellule tumorali mediante micro-dissezione laser.

## Estrazione DNA/RNA

- L'estrazione e la purificazione del DNA da tessuto paraffinato/strisci cellulari può essere eseguita utilizzando diverse metodiche. Sono in commercio diversi tipi di kit per le varie tipologie di campioni (fissati, congelati, micro-campioni quali piccole biopsie) che prevedono principalmente utilizzo di biglie magnetiche o membrane di silice. Una volta estratto, il DNA viene risospeso in tampone adeguato, quindi valutato sotto il profilo qualità/quantità mediante lettura spettrofotometrica.

## Valutazione stato mutazionale e riarrangiamenti

- La valutazione dello stato mutazionale/riarrangiamenti nei tumori delle vie biliari può essere effettuata con diverse tecniche molecolari, ciascuna caratterizzata da punti di forza e di debolezza. L'esecuzione dell'analisi mutazionale deve essere sempre sostenuta da specifiche esperienze di laboratorio e validata dalla stessa attività diagnostica e da programmi di controllo di qualità riconosciuti.
- Le tecniche di next generation sequencing (NGS) si basano sull'amplificazione clonale delle singole molecole di DNA, che successivamente vengono sequenziate indipendentemente ed in maniera ripetuta. A differenza quindi di quanto

accade nel sequenziamento classico nel quale l'elettroferogramma è un segnale "misto" che deriva dalla somma di sequenze mutate e non, nella NGS c'è una rappresentazione digitale delle singole sequenze il che, almeno in teoria, ne aumenta notevolmente la sensibilità. Inoltre, i sequenziatori di nuova generazione consentono di analizzare in un singolo esperimento quantità di genoma di gran lunga maggiori rispetto al sequenziamento classico. L'applicazione di NGS che trova il maggiore impiego in clinica è la cosiddetta "targeted resequencing", ovvero il sequenziamento di regioni definite del genoma, tipicamente coinvolte nella patogenesi delle neoplasie in quanto sedi di oncogeni ed antioncogeni. Sono disponibili in commercio diversi pannelli di NGS che contengono vari geni di interesse. La sensibilità analitica della maggioranza dei pannelli disponibili in commercio varia tra il 2% ed il 5%. Il vantaggio dell'impiego dell'NGS è sicuramente rappresentato dalla possibilità di effettuare in una singola analisi una caratterizzazione completa della neoplasia in esame.

- Nel caso vengano riscontrate tramite metodica molecolare (es. NGS) delle mutazioni a bassa frequenza allelica, se di interesse clinico, devono essere riconfermate con metodica alternativa (es. Real Time PCR). Se presenti riarrangiamenti/fusioni geniche di interesse clinico anch'esse devono essere riconfermate con metodica alternativa come ad es. la metodica FISH; in questo caso consigliato utilizzare una sonda break apart o split-signal essendo costituite da due regioni molecolari marcate in colori diversi che mappano rispettivamente al 3' e al 5' della regione genica che contiene tutti i punti di rottura. Questa tipologia di sonda non definisce la regione partner coinvolta nell'anomalia ma evidenzia il riarrangiamento di uno specifico gene ed è particolarmente utile per identificare riarrangiamenti in cui il gene partner è variabile e/o non noto. Ovviamente la riconferma mediante metodica FISH è eseguibile solo se il materiale a disposizione lo consente (presenza di incluso istologico o citologico).

## **MMR/MSI**

- L'instabilità dei microsatelliti (MSI) e la perdita di funzione delle proteine coinvolte nel sistema mismatch repair del DNA (MMR) sono marcatori oltre che diagnostici anche prognostici e predittivi in diversi tipi di tumore. I microsatelliti sono sequenze ripetute in tandem di DNA non codificante, costituiti da unità di ripetizioni di uno o pochi nucleotidi. Il sistema del MMR si basa su 4 proteine che lavorano insieme in complessi eterodimerici: MLH1 con PMS2 ed MSH2 con MSH6. La perdita di funzione di queste proteine porta all'inattivazione del MMR e conseguentemente all'instabilità dei microsatelliti.

- Le proteine del MMR si valutano tramite analisi immunoistochimica. L'instabilità dei microsatelliti si valuta tramite analisi molecolare di specifici loci microsatellitari il cui numero dipende dal pannello e dal test utilizzato. Due ripetizioni mononucleotidiche (BAT25 e BAT26) e tre ripetizioni di dinucleotidi (D5S346, D2S123 e D17S250) sono i siti standard in pannelli per i test MSI, come raccomandato dal National Cancer Institute. Se due o più delle ripetizioni sono alterate, il tumore è definito come MSI-H; se viene trovata solo una sequenza mutata, viene considerato il tumore a bassa instabilità dei microsatelliti (MSI-L). Altrimenti, si dice che il tumore abbia stabilità nei microsatelliti (MSS). In una percentuale ridotta di casi (3-10%) i risultati di test immunoistochimici e molecolari possono essere discordanti. Questo dipende dalle sensibilità e specificità dei test impiegati, dalle specifiche proteine per le quali si registra una perdita di espressione, dal numero dei loci di microsatelliti in esame, da meccanismi legati all'eterogeneità tumorale o da perdita di funzione di altre proteine coinvolte nella replicazione/riparazione del DNA. I casi discordanti vanno ulteriormente indagati, ripetendo i test o ampliando il pannello dei loci di microsatelliti analizzati.

- Visto l'alto livello di concordanza (quasi 90–95%) tra dMMR e MSI-H in diversi tumori, questi due biomarcatori sono usati quasi in modo intercambiabile.

- Si raccomanda che i laboratori coinvolti nell'attività MMR/MSI standardizzino le analisi e la refertazione (IHC e Molecolare). Raccomanda anche la partecipazione a Programmi di Verifica di Qualità Esterni o in alternativa organizzerà uno schema regionale come già fatto in passato per altre analisi molecolari.

## **Refertazione**

- Il referto è parte integrante della procedura diagnostica e deve contenere le seguenti informazioni: 1-identificazione del paziente e della struttura che ha richiesto l'analisi, 2-identificazione del campione utilizzato per l'analisi, 3-descrizione macroscopica, ivi inclusa la definizione della percentuale di cellule tumorali e la eventuale dissezione eseguita, con indicazione del medico Patologo responsabile, 4-la metodica impiegata per l'esecuzione dell'analisi con riferimento alla sensibilità del metodo, 5-esoni/codoni o le specifiche mutazioni sottoposte ad analisi, 6-risultati del test, con

specificazione del tipo di mutazione eventualmente rilevata ed indicazione del responsabile della esecuzione del test molecolare.

- In considerazione dell'impatto sulla strategia terapeutica, il tempo per la refertazione non deve superare le due settimane dalla richiesta della determinazione.