



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA**

Dottorato di Ricerca in Salute Dell'Uomo
XXX° Ciclo

**CARATTERIZZAZIONE
ISTOLOGICA E MOLECOLARE
NELLE PAZIENTI CON CARCINOMA OVARICO
SPORADICO ED EREDITARIO**

Relatore: Chiar.ma
Prof.ssa Rossana Berardi

Tesi di Dottorato di:
Dott.ssa Elena Maccaroni

Anno Accademico 2016 - 2017

ABSTRACT AND KEYWORDS	Pag. 5
1. RIASSUNTO	Pag. 6
2. INTRODUZIONE	Pag. 9
2.1 Epidemiologia, classificazione istopatologica e fattori prognostici neoplasie ovariche	Pag. 9
2.1.1. Fattori di rischio e fattori protettivi	Pag. 9
2.1.2. Nuove ipotesi patogenetiche delle neoplasie ovariche	Pag. 10
2.1.3. Istopatologia e caratterizzazione biologica	Pag. 11
2.1.4. Inquadramento diagnostico e diagnosi	Pag. 15
2.1.5. La stadiazione	Pag. 17
2.1.6. Fattori prognostici	Pag. 18
2.2. Il carcinoma ovarico ereditario	Pag. 20
2.2.1. Breast cancer (BRCA) susceptibility gene 1-2	Pag. 22
2.2.2. Struttura e funzione dei geni BRCA	Pag. 22
2.2.3. Gene BRCA1	Pag. 24
2.2.4. Gene BRCA2	Pag. 26
2.2.5. Modalità di trasmissione e mutazioni conosciute	Pag. 27
2.2.6 Il problema interpretativo delle varianti a significato patogenetico sconosciuto	Pag. 27
2.2.7. Counselling e test genetico	Pag. 29
2.2.8. Counselling pre-test	Pag. 30
2.2.9. Test genetico	Pag. 32
2.2.10. Risposta del test	Pag. 32
2.2.11. Comunicazione dei risultati e counselling post-	Pag. 33

test	
2.2.12. Sorveglianza e prevenzione del carcinoma ovarico in donne con mutazione BRCA	Pag. 34
2.2.13. Terapie personalizzate per le pazienti BRCA mutate: PARP-inibitori	Pag. 34
3. SCOPO DELLO STUDIO	Pag. 38
4. PAZIENTI E METODI	Pag. 39
4.1 Selezione delle pazienti	Pag. 39
4.2. Studio della sequenza dei geni BRCA1 e BRCA2	Pag. 41
4.2.1. Preparazione dei campioni	Pag. 41
4.2.2. Reazione a catena della polimerasi (PCR)	Pag. 41
4.2.3. Purificazione dell'amplificato	Pag. 41
4.2.4. Reazione e lettura di sequenza	Pag. 42
4.2.5. MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification)	Pag. 42
4.2.6. Classificazione delle mutazioni germinali di BRCA1 e BRCA2	Pag. 43
4.2.7. Analisi statistica dei dati	Pag. 44
4.2.8. Calcolo del detection rate (DR)	Pag. 45
5. RISULTATI	Pag. 46
5.1 Caratteristiche delle pazienti	Pag. 46
5.2. Tipologia e prevalenza delle mutazioni germinali a carico dei geni BRCA1 e BRCA2	Pag. 46
5.2.1. Mutazioni patogenetiche a carico dei geni BRCA1 e BRCA2	Pag. 48
5.2.2. Mutazioni a significato sconosciuto (VUS) a	Pag. 54

carico dei geni BRCA1 e BRCA2	
5.3. Correlazioni tra le mutazioni di BRCA1-2 e le caratteristiche clinico-patologiche	Pag. 57
5.3.1. Correlazione tra tipo istologico ed esito del test	Pag. 57
5.3.2. Correlazione con l'età alla diagnosi	Pag. 59
5.4. Calcolo del detection rate	Pag. 61
 6. DISCUSSIONE	 Pag. 62
 7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	 Pag. 67

ABSTRACT

Introduction: Ovarian cancer represents the leading cause of cancer deaths among gynecological malignancies. Germline mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes are associated with hereditary predisposition to breast and ovarian cancer. Together, germline mutations in BRCA1 and BRCA2 account for around 15% of OC cases.

The present study aimed at evaluating pathological and molecular characteristics of BRCA-wild type (sporadic) and BRCA-mutant (hereditary) ovarian cancer (OC) patients.

Patients and Methods: Between June 1996 and April 2017, 227 OC patients underwent genetic counselling and testing for BRCA1 and BRCA2 genes at Centro Regionale di Genetica Oncologica, Ancona. Detected BRCA mutations were divided based on their pathogenicity and type of genetic alteration (frameshift, nonsense, splice-site, missense, silent pathogenic mutations and large rearrangements).

Results: Globally, 68 pathogenic mutations and 35 Variants of Uncertain Significance (VUS) were identified. Pathogenic mutations were significantly more frequent in the BRCA1 gene (83%) *versus* BRCA2 gene (51%) ($p=0.00012$). High grade serous OC was the most frequently reported histotype (56.7%), followed by endometrioid OC (17%). Median age at diagnosis was 52.03 years (range 16-83 years). No significant differences in terms of age at diagnosis were observed between BRCA-mutant vs BRCA-wild-type patients, neither between BRCA1-mutant and BRCA2-mutant patients. Among 227 patients, 160 (70.5%) had a positive family history for BRCA-related cancers, while 67 (29.5%) had a negative family history. In the first group, 94 patients (28.2%) had a pathogenic BRCA mutation, while in the second group only 4 (1.8%) were carriers of a pathogenic mutation. Finally, the Detection Rate (DR), defined as the probability to detect a pathogenic BRCA mutation, resulted significantly higher (40%) in OC patients with a positive family history compared with patients with a negative family history (6%) ($p=0.0009$).

Conclusions: This work suggests the importance to analyze BRCA genes in OC patients in the Marche Region, as to perform comparisons among mutational and clinic-pathological features in our Region and in other geographical areas.

Keywords: ovarian cancer, BRCA, hereditary, germline mutation

1. RIASSUNTO

Le neoplasie dell'ovaio costituiscono il 3% di tutti i tumori femminili e rappresentano le neoplasie ginecologiche con la più alta mortalità nel sesso femminile. Negli ultimi decenni si è cercato di chiarire gli aspetti patogenetici e di indagare i fattori di rischio, proponendo nuove opzioni terapeutiche.

Circa il 10-15% delle pazienti affette da carcinoma ovarico presenta mutazioni germinali a carico dei geni di suscettibilità BRCA1 e BRCA2. Le donne portatrici di tali mutazione hanno una maggiore probabilità di sviluppare neoplasie dell'ovaio. È stato dimostrato che le pazienti con mutazione BRCA presentano una prognosi migliore e una più spiccata risposta alla terapia con derivati del platino, nonché la possibilità di essere trattate con una categoria di farmaci specifici, i PARP inibitori. Da ciò deriva l'importanza ad effettuare il test genetico sui geni in questione in tutte le pazienti con carcinoma ovarico.

Il presente studio si iscrive nell'ambito della valutazione delle caratteristiche istologiche e molecolari nelle pazienti affette da carcinoma ovarico sporadico ed ereditario, dovuto cioè a mutazioni germinali a carico dei geni BRCA1 e BRCA2. Gli obiettivi del presente studio sono stati i seguenti: determinare la tipologia e la prevalenza delle mutazioni germinali a carico dei geni BRCA1 e BRCA2 nella popolazione globale delle pazienti affette da carcinoma ovarico sottoposte a test genetico presso il Centro Regionale di Genetica Oncologica-AOU Ospedali Riuniti di Ancona, Università Politecnica delle Marche; analizzare le caratteristiche istopatologiche in relazione alla presenza/assenza di mutazioni a carico di BRCA1/2; analizzare la correlazione tra caratteristiche cliniche quali l'età di insorgenza della malattia e la familiarità con la presenza/assenza di mutazioni di BRCA1/2 ed infine stimare il detection rate (DR) relativo al test genetico nella popolazione in oggetto.

Nel periodo compreso tra Giugno 1996 ed Aprile 2017, 227 pazienti affette da carcinoma ovarico sono state sottoposte a consulenza genetica e successivo test dei geni BRCA1 e BRCA2 presso il Centro Regionale di Genetica Oncologica-AOU Ospedali Riuniti di Ancona. Trattandosi, quest'ultimo, dell'unico centro di riferimento nella regione, le 227 pazienti analizzate nello studio rappresentano con buona approssimazione l'intera popolazione affetta da carcinoma ovarico nella Regione

Marche del periodo considerato. Le mutazioni riscontrate a carico dei geni BRCA1 e BRCA2 sono state distinte in base alla loro patogenicità e in base al tipo di alterazione genica prodotta. Complessivamente sono state identificate 68 mutazioni patogenetiche e 35 a significato sconosciuto (VUS).

È stata inoltre calcolata la frequenza percentuale delle mutazioni patogenetiche e di quelle dal significato sconosciuto rispetto al totale delle mutazioni riscontrate in ciascun gene. Tra le varianti identificate, è stata riscontrata una frequenza di mutazioni patogenetiche significativamente superiore ($p=0,00012$) a carico del gene BRCA1 (83%) rispetto al gene BRCA2 (51%). Le mutazioni riscontrate nella nostra casistica sono state successivamente ricercate in letteratura per valutare se la loro frequenza nella Regione Marche rispecchiasse o meno quella riportata in altri studi nel mondo. Tra le mutazioni patogenetiche della nostra casistica, la maggior parte sono state riscontrate in una singola paziente.

Relativamente alle caratteristiche istologiche, l'istotipo sieroso di alto grado è risultato il più rappresentato nella casistica analizzata (56,7%), seguito dall'endometrioide (17,5%) e dall'adenocarcinoma non altrimenti specificato (NAS) (7%). Non è stata osservata alcuna differenza significativa in termini di frequenza dell'istotipo sieroso di alto grado tra le pazienti BRCA-mutate e le pazienti BRCA wild-type ($p=0.45$).

Delle 227 pazienti prese in esame dallo studio, l'età media alla diagnosi è risultata pari a 52,03 anni (range 16-83 anni). Non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa in termini di età media alla diagnosi tra pazienti con BRCA-mutate e pazienti wild-type. Inoltre, non è stata altresì riscontrata, nell'ambito delle pazienti BRCA mutate, alcuna differenza tra pazienti con mutazione BRCA1 e pazienti con mutazione BRCA2.

Tuttavia, la deviazione standard dell'età media alla diagnosi è risultata significativamente diversa tra pazienti BRCA-mutate e pazienti wild-type, e soprattutto tra pazienti BRCA1 e BRCA2-mutate: questo lascia supporre che, sebbene la diagnosi non avvenga in età più precoce nelle pazienti BRCA1-mutate, tuttavia la maggior parte dei casi si concentra intorno ai 51 anni, con una variabilità più ampia nelle pazienti BRCA2-mutate e wild-type.

Relativamente alla familiarità, su 227 pazienti, 160 (70,5%) avevano familiarità per neoplasie dello spettro BRCA e 67 (29,5%) non l'avevano. Mentre nel primo gruppo 64 pazienti (28,2%) sono risultate portatrici di una mutazione patogenetica, nel secondo gruppo lo erano solamente 4 pazienti (1,8%). Infine è stato calcolato il detection rate

(DR), cioè la probabilità di riscontrare una mutazione patogenetica BRCA. Per il gruppo di pazienti con carcinoma ovarico con familiarità per neoplasie dello spettro BRCA il DR è risultato significativamente superiore (40%) rispetto a quello delle pazienti con carcinoma ovarico e familiarità assente (6%) ($p=0,0009$).

In conclusione, con questo lavoro si vuole sottolineare l'importanza della conoscenza e dell'analisi sistematica dello spettro mutazionale dei geni BRCA 1 e 2 di tutte le pazienti con carcinoma ovarico nella Regione Marche, con lo scopo di rendere possibili confronti tra andamenti clinico-patologici e mutazionali nel nostro territorio con ciò che accade in altre aree geografiche.

Il riscontro di parametri con lo stesso andamento in regioni diverse può infatti sottolinearne la significatività, far emergere aspetti altrimenti sottovalutati e stimolarne l'approfondimento. Allo stesso modo, il riscontro di dati contrastanti può spingere ad effettuare ulteriori studi.

Da questo genere di studi, se eseguiti su larga scala, non è da escludere che possano emergere utili dati dalla valenza di fattori prognostici o predittivi.

2. INTRODUZIONE

2.1 Epidemiologia, classificazione istopatologica e fattori prognostici neoplasie ovariche

Le neoplasie dell'ovaio rappresentano il 3% di tutti i tumori femminili e costituiscono il 30% di tutti i tumori maligni dell'apparato genitale femminile (1,2).

Il maggior numero di nuovi casi si riscontra in Europa e in Nord America: ogni anno in Europa si stimano 65.000 nuovi casi, mentre in Italia sono circa 4.800 i nuovi casi e 3.600 i decessi all'anno.

Dagli anni Ottanta l'incidenza si è ridotta e, nell'ultimo decennio, negli Stati Uniti e in Europa occidentale, si stima un declino di circa il 2% l'anno. La mortalità è in diminuzione invece dell'1% l'anno. Per quanto riguarda la prevalenza i dati WHO indicano circa 165.000 donne malate nel mondo e 46.000 in Europa (3).

Le neoplasie ovariche sono considerate una patologia peri e post menopausale, con il maggior numero di diagnosi (più dell'80%) in donne con più di 50 anni, mentre nelle donne giovani il rischio di malattia è molto più basso (1 caso su 499) (2,4).

La mortalità per il tumore dell'ovaio è estremamente elevata, tanto da rappresentare la quinta causa di morte femminile per neoplasia nei paesi sviluppati e la prima causa tra i tumori ginecologici. La sopravvivenza a 5 anni negli ultimi anni è aumentata passando dal 38% (1990-1994) al 41% (2000-2004). Questa è ampiamente influenzata sia dall'età delle pazienti stesse che dallo stadio FIGO con cui si presenta la malattia (5).

2.1.1 Fattori di rischio e fattori protettivi

Il tumore dell'ovaio può essere considerato una patologia multifattoriale influenzata da molteplici fattori inquadrabili in tre categorie: genetici - familiari, endocrini e ambientali.

Le sindromi genetiche determinanti un aumentato rischio di tumori ovarici rispetto alla popolazione generale sono:

- Brest-ovarian cancer syndrome (mutazione dei geni BRCA1/BRCA2)
- Site specific ovarian cancer syndrome (mutazione dei geni BRCA1/BRCA2)

- Sindrome di Lynch 2 (mutazione dei geni MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 o EPCAM) che predispone a carcinoma del colon non associato a poliposi, carcinomi endometriali, dell'uretere, gastrici e ovarici
- Sindrome di Cowden (mutazione di PTEN) che predispone a tumori ovarici e cerebrali
- Sindrome di Gorlin (mutazione di PTCH1) che predispone a tumori ovarici e nevi multipli

Le varianti patogenetiche costituzionali di BRCA hanno una prevalenza del 10% tra le pazienti con tumore ovarico, tale prevalenza sale al 20% considerando solo il carcinoma ovarico sieroso e ulteriormente al 30-40% considerando tra questi solo i platino-sensibili. (6-8)

Per quanto riguarda i fattori endocrini sia la multiparità che l'allattamento al seno riducono il rischio di tumore ovarico. Riguardo l'utilizzo di contraccettivi ormonali esistono invece pareri contrastanti in letteratura. Secondo alcuni studi l'impiego dei contraccettivi ormonali avrebbe un ruolo protettivo sulla carcinogenesi ovarica proporzionale agli anni di assunzione, e resterebbe poi attivo anche a distanza di 20-30 anni dalla loro sospensione. Tale effetto protettivo è stato rilevato anche nelle donne portatrici di mutazione BRCA1/2 (9).

Al contrario la terapia ormonale sostitutiva sembrerebbe determinare un aumento dell'incidenza di carcinoma ovarico (10). Infine per quanto riguarda le donne sottoposte a FIVET è ancora incerto se l'uso di gonadotropine e/o clomifene citrato sia associato ad un aumento di neoplasie ovariche (11).

Tra le esposizioni ambientali sono state dimostrate essere rilevanti fattori di rischio il fumo di sigaretta, l'esposizione ad asbesto e talco, l'abuso di alcol, l'obesità e la dieta ricca di grassi (12,13).

2.1.2 Nuove ipotesi patogenetiche delle neoplasie ovariche

Le nuove ipotesi patogenetiche ipotizzano che il carcinoma sieroso dell'ovaio possa derivare non dall'epitelio di superficie dell'ovaio stesso ma da cellule dell'epitelio tubarico che si impiantano sulla superficie dell'ovaio. Ciò è testimoniato dal fatto che circa il 70% dei carcinomi sierosi dell'ovaio si associano a un carcinoma sieroso intraepiteliale della tuba (STIC, serous tubal intraepithelial carcinoma).

In primo luogo la fimbria tubarica al momento dell'ovulazione è in stretto contatto con la superficie dell'ovaio, perciò le cellule epiteliali possono facilmente impiantarsi sulla superficie della gonade (14,15). Inoltre la fimbria tubarica durante la mestruazione retrograda è esposta allo stress ossidativo indotto dal ferro derivato dalla lisi dei globuli rossi. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) prodotte andrebbero a causare perossidazione lipidica, rotture delle eliche del DNA, attivazione di oncogeni e inibizione di geni oncosoppressori (16,17).

Queste nuove teorie di cancerogenesi amplificano le problematiche di ricerca di un valido metodo di screening nella popolazione generale.

2.1.3 Istopatologia e caratterizzazione biologica

La caratterizzazione istopatologica delle neoplasie ovariche segue la classificazione WHO (World Health Organization) del 2002, nella quale esse sono state suddivise in primitive e secondarie (vedi Tabella 1). I tumori primitivi originano dagli elementi che costituiscono l'ovaio cioè l'epitelio di superficie, lo stroma ovarico, i cordoni sessuali e le cellule germinali; i tumori secondari invece sono quelli che metastatizzano all'ovaio da neoplasie primarie extraovariche (prime tra tutte le neoplasie del tratto digerente) (18).

Il carcinoma sieroso invasivo è il tipo istologico più comune tra i tumori ovarici avanzati (80%). È stato inoltre dimostrato come la forma a basso grado (low-grade) e quella di alto grado (high-grade) di malignità rappresentano due entità distinte di malattia (19,20).

Per la determinazione del grado di malignità, la WHO divide le neoplasie in tre gradi di differenziazione: G1 differenziato, G2 moderatamente differenziato, G3 scarsamente differenziato (21).

CLASSIFICAZIONE ISTOLOGICA DELLE NEOPLASIE OVARICHE (modificata da WHO, 2002)	
TUMORI EPITELIALI	
Tumori sierosi	
<u>Benigni</u> • Cistoadenoma • Papilloma di superficie • Cistoadenofibroma	
<u>Borderline</u> • Tumori a basso potenziale di malignità	
<u>Maligni</u> • Carcinoma infiltrante	
Tumori mucinosi	
<u>Benigni</u> • Cistoadenoma • Papilloma di superficie • Cistoadenofibroma	
<u>Borderline</u> • Tumori a basso potenziale di malignità	
<u>Maligni</u> • Carcinoma infiltrante	
Tumori endometrioidi	
<u>Benigni</u> • Cistoadenoma • Cistoadenofibroma	
<u>Borderline</u> • Tumori a basso potenziale di malignità	
<u>Maligni</u> • Carcinoma infiltrante	
Tumori a cellule chiare	
<u>Benigni</u> • Cistoadenoma	
<u>Borderline</u> • Tumori a basso potenziale di malignità	
<u>Maligni</u> • Carcinoma infiltrante	
Tumori a cellule transizionali	

<u>Benigni</u> • Tumore di Brenner
<u>Borderline</u> • Tumore di Brenner a basso potenziale di malignità
<u>Maligni</u> • Tumore di Brenner maligno • Carcinoma a cellule transizionali
Tumori a cellule squamose
<u>Maligni</u> • Carcinoma a cellule squamose
Tumori epiteliali misti
<u>Benigni</u> <u>Borderline</u> <u>Maligni</u>
Tumori indifferenziati
<u>Maligni</u> • Carcinoma indifferenziato • Adenocarcinoma NAS
TUMORI DELLO STROMA E DEI CORDONI SESSUALI
Tumori della granulosa e stromali
Tumore a cellule della granulosa • Tumore a cellule della granulosa giovanile • Tumore a cellule della granulosa dell'adulto
Tumori del gruppo fibroma-tecoma • Tecoma tipico • Tecoma luteinizzato • Fibroma cellulato • Fibrosarcoma • Tumore stromale sclerosante • Tumori non classificabili
Tumori a cellule di Sertoli-Leydig • Tumori ad elevato grado di differenziazione • Tumori a medio grado di differenziazione • Tumori a scarso grado di differenziazione • Tumori a cellule di Sertoli-Leydig con elementi eterologhi • Tumori a cellule di Sertoli-Leydig variante retiforme • Tumori a cellule del Sertoli
Tumori dei cordoni sessuali misti o inclassificabili
Tumori a cellule steroidee
TUMORI A CELLULE GERMINALI
Tumori a cellule germinali immature
• Disgerminoma • Carcinoma embrionale • Corioncarcinoma • Tumore del sacco vitellino (Yolk sac tumor) • Teratoma immaturo
Tumori a cellule germinali mature

- Teratoma maturo cistico
- Teratoma maturo cistico con trasformazione maligna (carcinoma squamoso)

TUMORI METASTATICI

Tabella 1: Classificazione istologica delle neoplasie ovariche, modificata da WHO 2002 (18)

La caratterizzazione prognostica del tumore ovarico basata sui classici parametri clinico-patologici (stadio FIGO di malattia, istotipo, grado di differenziazione, malattia residua dopo trattamento chirurgico) risulta, oggi, insufficiente essendo emersa l'evidente rilevanza prognostica di alcuni fattori correlati alla biologia del tumore.

Recenti acquisizioni hanno mostrato come il cancro ovarico non sia una malattia unica, ma rappresenti almeno 5 diversi tipi tumorali, caratterizzati diversa origine, specifici pathways molecolari, peculiarità cliniche e differenti risposte alla chemioterapia (15,22).

A livello clinico, cellulare e molecolare i tumori ovarici epiteliali ricadono all'interno di due gruppi maggiori in base al loro grado istologico, fenotipo molecolare e genotipo, denominati tipo I e tipo II.

I *tumori di tipo I* comprendono il carcinoma sieroso di basso grado, il carcinoma endometrioidale di basso grado, il carcinoma a cellule chiare, il carcinoma mucinoso ed il tumore di Brenner. Queste neoplasie hanno in genere un decorso clinico indolente, sono diagnosticate spesso in stadio iniziale, presentano raramente mutazioni del gene p53, e sono geneticamente stabili. Ogni variante istologica ha un distinto profilo molecolare, con mutazioni di diversi geni coinvolti in differenti vie di trasduzione del segnale, quali KRAS, BRAF, CTNNB1, PTEN, PIK3CA e ARID1A.

I *tumori di tipo II*, che rappresentano il 75% dei casi, comprendono il carcinoma sieroso di alto grado, il carcinoma endometrioidale di alto grado, il carcinoma indifferenziato ed il carcinosarcoma. Questi tumori hanno un comportamento biologico molto aggressivo, sono spesso in stadio avanzato alla diagnosi, hanno una mutazione del gene p53 nell'80% dei casi e sono geneticamente instabili. Non di rado queste neoplasie, anche se sporadiche e non ereditarie, hanno un deficit dei meccanismi di ricombinazione omologa (*homologous recombination* [HR] essenziali per la riparazione del DNA. Al momento ad eccezione della presenza della mutazione di BRCA, che condiziona una prognosi più favorevole e migliore sensibilità ad alcuni farmaci, ci sono poche circostanze nelle quali la conoscenza di un fattore prognostico guida la terapia delle pazienti con carcinoma ovarico. Con l'aumento della conoscenza dei meccanismi di azione di differenti farmaci, e con l'introduzione di nuovi farmaci nella pratica clinica,

la caratterizzazione di fattori prognostici e predittivi sul tessuto neoplastico, da parte del patologo, potrà consentire di selezionare i farmaci per una terapia mirata (vedi Tabella 2) (15, 22-24).

	SIEROSO DI ALTO GRADO	SIEROSO DI BASSO GRADO	ENDOMETRIOIDE	CELLULE CHIARE	MUCINOSO
SEDE DI ORIGINE presunta	Tuba fimbria o metaplasia tubarica in cisti inclusione OSE	Tumore sieroso borderline	Endometriosi Adenofibroma borderline	Endometriosi Adenofibroma borderline	Adenoma borderline Teratoma
RISCHIO GENETICO	BRCA1/2	?	HNPCC	?	?
STADIO alla diagnosi	Avanzato	Precoce Avanzato	Precoce	Precoce	Precoce
ALTERAZIONI MOLECOLARI	p53 p16 pathway pRB BRAC- HRD	Braf Kras	PTEN β-catenina Kras MSI ARID1A	HNF-1β IL6/JAK2/ST AT3 PI3K MSI ARID1A	Kras HER2
RISPOSTA CHEMIOTERAPICA	80%	26-28%	?	15%	15%
POTENZIALI TARGETS	PARPi Angiogenesi	BRAF MEK	Terapia ormonale mTOR	Angiogenesi come rene?	Come colon?

Tabella 2: Caratteristiche delle 5 tipologie di tumore ovarico

2.1.4 Inquadramento diagnostico e diagnosi

Le pazienti con carcinoma ovarico restano a lungo asintomatiche e questo è un ulteriore motivo per cui la diagnosi avviene spesso in fase avanzata. La sintomatologia è nella maggior parte dei casi aspecifica e può comprendere:

- Distensione addominale e senso di peso
- Dolore pelvico o addominale
- Precoce sazietà dopo i pasti
- Sintomi da compressione sugli organi pelvici o addominali (pollachiuria, alterazioni dell'alvo)
- Massa pelvica palpabile e fissa di consistenza solida o solido-cistica
- Perdite ematiche vaginali atipiche

- Astenia, anoressia o altri segni tipici della malattia metastatica

La presenza di una massa annessiale o la persistenza degli altri sintomi elencati deve far sospettare una neoplasia maligna a prescindere dall'età della paziente. Una volta rilevati dall'anamnesi o dall'esame obiettivo questi sintomi e segni si rende necessario l'approfondimento con:

- Accurata anamnesi personale e familiare
- Ecografia transvaginale ed ecografia dell'addome superiore
- Dosaggio dei marcatori sierici CA125 e HE-4
 - CA125: è una glicoproteina espressa dall'epitelio ovarico di superficie. Livelli sierici elevati (>35 U/ml) possono essere riscontrati in più del 90% delle pazienti con tumore in stadio avanzato e nel 50% di quelle in stadio precoce, tuttavia tale dato è caratterizzato da una bassa specificità. La possibilità di un aumento aspecifico di CA125 ne esclude la validità come esame di screening per il carcinoma ovarico, mentre la sua utilità è comprovata per seguire l'evoluzione della malattia, una volta diagnosticata;
 - HE-4: Human epididymal secretory protein, sembra offrire promettenti risultati nella diagnosi differenziale delle tumefazioni annessiali, con una sensibilità maggiore del CA125 soprattutto negli stadi iniziali di malattia (25)
- Eventuale dosaggio di CEA e CA19.9 per escludere una malattia gastroenterica
- RMN pelvica con mdc (gadolinio): fornisce un'eccellente caratterizzazione dei tessuti sulla base delle proprietà di segnale e permette la diagnosi sicura di lesioni benigne a contenuto lipidico o emorragico. La captazione del mdc aiuta a delineare le strutture interne di lesioni cistiche e la presenza di noduli solidi o estroflessioni papillari. Ha una specificità dell'84% e una sensibilità del 97%;
- TC torace/addome di stadiazione o PET/TC. La PET/TC rappresenta la tecnica di imaging maggiormente accurata nella stadiazione prechirurgica e nella pianificazione terapeutica qualora sia dubbia la citoriducibilità della lesione. Nel sospetto di secondarietà della lesione ovarica è raccomandata l'esecuzione di esami endoscopici come rettoscopia, cistoscopia o gastroscopia (26,27).

2.1.5 La stadiazione

L'intervento chirurgico è funzionale sia alla diagnosi che alla stadiazione del carcinoma ovarico poiché consente di valutare con precisione ed accuratezza l'estensione anatomica della malattia.

Nel carcinoma dell'ovaio, così come per gli altri tumori ginecologici, la stadiazione che viene ad essere utilizzata è quella proposta dalla FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) (vedi Tabella 3) (28,29).

Stadio 1	Tumore limitato alle ovaie	IA: tumore limitato ad 1 ovaio, no tumore sulla superficie, no capsula rotta, washing negativo IB: come sopra, coinvolge entrambe le ovaie IC: tumore sulla superficie o rottura della capsula durante la chirurgia o cellule maligne in ascite o washing peritoneale
Stadio 2	Tumore che coinvolge una o entrambe le ovaie (sotto la linea pelvica) o tumore primitivo peritoneale	IIA: estensione/impianto in utero o nelle tube di Falloppio IIB: estensione ad altri tessuti pelvici intraperitoneali
Stadio 3	Tumore che coinvolge una o entrambe le ovaie con conferma citologica o istologica diffuso al peritoneo extrapelvico e/o metastasi ai linfonodi retroperitoneali	IIIA 1: solo linfonodi retroperitoneali positivi 2: coinvolgimento peritoneale extrapelvico microscopico +/- linfonodi retroperitoneali positivi IIIB: metastasi peritoneali extrapelviche ≤ 2cm +/- linfonodi retroperitoneali positivi. Include il coinvolgimento della capsula epatica o splenica IIIC: metastasi peritoneali extrapelviche > 2cm +/- linfonodi retroperitoneali positivi. Include il coinvolgimento della capsula epatica o splenica
Stadio 4	Metastasi a distanza escluse le metastasi peritoneali	IVA: versamento pleurico con citologia positiva IVB: metastasi parenchimali epatiche o spleniche, metastasi ad organi extraddominali (includendo i linfonodi inguinali e i linfonodi al di fuori della cavità addominale)

Tabella 3: Stadiazione dei tumori ovarici, modificata da FIGO 2014 (28,29)

2.1.6 Fattori prognostici

Lo stadio di malattia ha un'importante valenza prognostica, infatti i tassi di sopravvivenza a 5 anni variano ampiamente sulla base dello stadio alla diagnosi (Tabella 4). La stadiazione FIGO che permette di classificare la malattia in uno stadio iniziale (stadio I e II) e uno avanzato (stadio III e IV) (30).

Sopravvivenza a 5 anni	
Stadio I	70-90%
Stadio II	50-60%
Stadio III	20-40%
Stadio IV	10%

Tabella 4: tassi di sopravvivenza a 5 anni in base allo stadio

Negli stadi iniziali di malattia i fattori che maggiormente vengono considerati per stabilire la prognosi sono rappresentati da: grado di differenziazione, età della paziente, sottotipo istologico (l'indifferenziato ha prognosi peggiore), crescita extracapsulare, dimensioni tumorali, ascite e performance status (31).

Negli stadi avanzati i fattori associati a prognosi sfavorevole sono: istotipo mucinoso (se diagnosticato in fase avanzata è caratterizzato da una ridotta probabilità di risposta alla I linea di terapia con platino) (32); istotipo a cellule chiare (ridotta risposta al trattamento con platino); residuo di malattia dopo chirurgia primaria (debulking sottototale) (33); livelli sierici di Ca125. Dopo exeresi chirurgica l'emivita del marcatore è di circa 6 giorni. Il mantenimento di un livello superiore alla norma dopo 20 giorni dall'intervento è considerato un fattore prognostico negativo (34).

Un altro aspetto prognostico importante da tenere in considerazione è rappresentato dall'assetto genetico della malattia. Studi hanno dimostrato che le donne con la mutazione di BRCA hanno una prognosi migliore grazie a una maggior sensibilità di risposta al platino e la possibilità di utilizzare PARP inibitori.

Le donne BRCA mutate con carcinoma ovarico hanno una prognosi migliore delle donne con carcinoma ovarico non ereditario. Il deficit di ricombinazione omologa è stato osservato non soltanto nelle pazienti con carcinoma ovarico con mutazioni germinali di BRCA1 o BRCA2 ma anche in quelle con mutazioni somatiche, silenziamento epigenetico di tali geni, o perdita di funzione di altri geni, quali RAD51,

ATM, RAD3, ATR. Queste pazienti hanno un fenotipo che viene definito “BRCAness” perché è simile a quello delle pazienti con mutazioni germinali di BRCA1 e BRCA2 e comprende istologia sierosa, elevate percentuali di risposta alla prima e alle successive linee di terapia a base di platino, lunghi intervalli di tempo tra le recidive e maggiore sopravvivenza globale. La presenza del profilo “BRCAness” identifica un sottogruppo di pazienti con carcinoma ovarico sporadico a prognosi migliore, e con un’ottima responsività al platino e agli agenti PARP inibitori (35-37).

Infine, altro fattore molto studiato, è l’angiogenesi il cui principale marker di riconoscimento è l’espressione del “Vascular Endothelial Growth Factor” (VEGF). Questo, se iperespresso nelle cellule tumorali, indica un’evoluzione sfavorevole, tuttavia potrebbe indicare anche una buona risposta al Bevacizumab, farmaco VEGF-inibitore.

Oltre a quelle dei suddetti geni BRCA e VEGF sono riconosciute altre mutazioni prognosticamente importanti che però non fungono ancora da guida in scelte terapeutiche. Ad esempio è da sottolineare il ruolo dell’iperespressione dell’enzima ciclo-ossigenasi-2 (COX-2) nella neoangiogenesi visto che la sua espressione risulta correlata con la produzione del VEGF (38). Altri esempi sono le mutazioni più spesso riscontrate nei tumori di tipo I come la perdita di espressione di ARID1A che si associa ad una più precoce progressione di malattia e ad una minore sopravvivenza globale, o l’elevata espressione di HNF-1 β che correla viceversa con una prognosi migliore. La p53 invece è tipicamente mutata nei tumori di tipo II. È emerso come la sua sovraespressione correli con una minore responsività ai composti del platino e quindi con una prognosi peggiore, ma ad una migliore risposta ai regimi con taxani. La proteina p21 a sua volta risulta determinante in quanto modulando l’azione della p53 e bloccando il ciclo cellulare favorisce l’apoptosi indotta dagli agenti genotossici. La sua positività immunoistochimica correla dunque con una migliore prognosi. L’inattivazione dell’inibitore delle chinasi ciclino-dipendenti p16, che pure è frequente nei tumori di tipo II, correla infine con una minore sopravvivenza (39).

2.2 Carcinoma ovarico ereditario

Un tumore si definisce *sporadico* quando non sono presenti altri casi nella stessa famiglia e in assenza di elementi che ne facciano sospettare la natura ereditaria. Un tumore si definisce invece *familiare* quando sono presenti parenti di primo grado affetti dallo stesso tipo di neoplasia nello stesso lato della famiglia. Quando è presente una familiarità non è sottintesa la trasmissione genetica, tuttavia questa potrebbe anche essere presente seppure non dimostrabile in base alle attuali conoscenze. Il tumore è invece definito *ereditario* solo quando in una famiglia vi è la predisposizione a sviluppare quel determinato tipo di neoplasia a causa di una specifica mutazione a carico di un gene noto che si trasmette da una generazione all'altra conferendo la suscettibilità alla malattia. Quello che viene ereditato con la mutazione non è il tumore stesso, ma un'aumentata suscettibilità a svilupparlo.

Nelle forma neoplastiche ereditarie le mutazioni responsabili dell'aumentata probabilità di sviluppare una neoplasia sono presenti in tutte le cellule dell'organismo, comprese le cellule germinali, per cui possono essere trasmesse alle generazioni successive.

I tumori ereditari sono caratterizzati da alcuni aspetti peculiari, comuni a tutte le neoplasie legate ad un'eziologia genetica:

- **Aggregazione:** presenza di più parenti affetti dallo stesso tumore o da tumori appartenenti alla stessa sindrome
- **Verticalità:** più generazioni colpite dalla neoplasia
- **Precocità:** la neoplasia si presenta in età più giovane rispetto a quanto avvenga per i corrispondenti tumori sporadici nella popolazione generale
- **Anticipazione:** l'età di insorgenza della neoplasia diminuisce da una generazione alla successiva

Per quanto riguarda il cancro ovarico diversi sono i geni che, se mutati, conferiscono aumentata suscettibilità all'insorgenza di neoplasia: abbiamo precedentemente citato i geni del MMR, PTEN, PTCH, ma quelli più frequentemente coinvolti e che sono accompagnati da rischio più alto sono il gene BRCA1 e il gene BRCA2 (vedi Tabella 5)

(40)

GENE DI SUSCETTIBILITA'	Sindrome	Rischio di CANCRO OVARICO ai 70 anni	Altre neoplasie associate
BRCA1	HBOC	20-40%	Mammella, pancreas
BRCA2	HBOC	10-20%	Mammella, pancreas, prostata
MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2 (geni del MMR)	S.LYNCH 2	10%	Colon-retto, piccolo intestino, stomaco, utero, pelvi renale, uretere
PTEN	S. COWDEN	circa 1%	Mammella, tiroide, endometrio, genitourinario
PTCH 1	S. GORLIN	fibromi ovarici a basso potenziale evolutivo nel 75% delle pazienti affette	Cute, Snc
STK11	S. PEUTZ JEGHERS	tumori dei cordoni sessuali (Cellule del Sertoli)	Piccolo intestino, colon-retto, testicolo, utero

Tabella 5: Geni di suscettibilità per tumore ovarico e sindromi associate (40)

2.2.1 Breast cancer (BRCA) susceptibility gene 1-2

Se nelle donne della popolazione generale il rischio di sviluppare un carcinoma dell'ovaio è di circa l'1,4%, nelle pazienti con mutazione genetica BRCA1 sale al 39% ed è del 11-17% nelle pazienti con BRCA2 mutato (41).

Per quanto riguarda il tumore mammario, il rischio correlato all'insorgenza durante la vita sale rispettivamente al 39-87% nelle donne con mutazione BRCA1 e al 26-91% nelle BRCA2, contro un rischio del 10% circa nella popolazione generale (42).

2.2.2 Struttura e funzione dei geni BRCA

Il gene BRCA1 (Breast Cancer 1) è posizionato sul braccio lungo del cromosoma 17 (17q12-21) ed è costituito da 24 esoni che codificano per una proteina di 1863 aminoacidi, mentre BRCA2 (Breast Cancer 2), posizionato sul braccio lungo del cromosoma 13, è un gene di grandi dimensioni, costituito da 27 esoni che codificano per una proteina di 3418 aminoacidi (43).

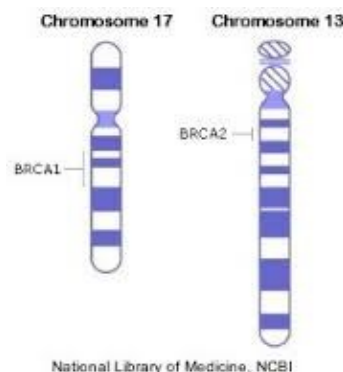


Figura 1: Posizione geni BRCA1 e BRCA2 nei corrispettivi cromosomi

Questi due geni vennero scoperti negli anni '90 grazie a studi sugli Ebrei Ashkenazi, una popolazione "isolata" in cui, proprio per questa caratteristica, è possibile testare la presenza di mutazioni "founder", cioè specifiche mutazioni particolarmente frequenti in determinate popolazioni.

BRCA1 e BRCA2 sono geni di grandi dimensioni con un ampio spettro mutazionale, non sono presenti *hotspots* mutazionali e quindi le mutazioni patogeniche possono disperse nei 24 esoni di BRCA1 e nei 27 esoni di BRCA2 lungo tutta la regione codificante.

Anche la natura delle alterazioni germinali è estremamente variabile.

A livello trascrizionale, queste alterazioni comportano l'alterazione morfologica e/o funzionale della catena del DNA e, quindi, della proteina che il gene interessato codifica. Le mutazioni possono essere di diverso tipo:

- **Missenso:** nella catena del DNA una base azotata è sostituita con un'altra, e ciò comporta la sostituzione di uno degli amminoacidi che costituiscono la proteina con uno diverso. Questo tipo di mutazioni può essere neutra e non determinare nessun fenotipo specifico, rappresentando semplicemente un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP), ma può anche dare origine al mancato funzionamento della proteina, ad esempio se l'amminoacido codificato dalla nuova tripletta presenta proprietà molto diverse dal precedente.
- **Non-senso:** si verificano quando una mutazione ad un nucleotide di una tripletta del DNA determina la trasformazione di un codone codificante un amminoacido in un codone di stop. L'inserimento di un codone di STOP prematuro nell'RNA messaggero (m-RNA) porta alla trascrizione di una proteina trunca e, quindi, non funzionante.
- **Silenti:** si verificano quando la sostituzione di una base azotata in una sequenza di DNA non determina variazione della sequenza amminoacidica della proteina interessata. Le mutazioni silenziose sono in prevalenza neutre poiché l'amminoacido non cambia e di conseguenza non cambia neppure la funzionalità della proteina codificata all'interno della quale si trova la tripletta mutata. Tuttavia mutazioni silenziose alle sequenze ESS (Exonic Splicing Silencer) coinvolte nel meccanismo di splicing del trascritto primario, possono invece portare all'esclusione di un esone dall'mRNA maturo e di conseguenza alla codifica di proteine tronche da parte dei ribosomi.
- **Frameshift:** sono dovute a delezione o inserzioni di un numero di nucleotidi non divisibile per 3, questo comporta lo spostamento della cornice di lettura a valle della mutazione e quindi la codificazione di una sequenza amminoacidica non corrispondente a quella del trascritto originario. La conseguenza è la produzione di proteine anomale che hanno solo porzioni di sequenza corrispondenti all'originaria o la mancata esportazione o traduzione dell'mRNA mutato.

- **Mutazioni nel sito di splicing (splice-site):** i siti di splicing sono sequenze del gene che identificano la giunzione tra due esoni e delimitano una regione del gene che non è codificata nell'RNA messaggero. Le mutazioni di splicing sono un insieme di quattro tipi di mutazioni che coinvolgono sequenze importanti per lo splicing del pre-Mrna. Una prima tipologia coinvolge il sito donatore di splicing (GT) o il sito accettore (di norma AG). Mutazioni in questi due marcatori iniziale e finale di una sequenza intronica possono portare all'inclusione dell'introne nel trascritto maturo oppure ad uno splicing non corretto. Una seconda tipologia coinvolge brevi sequenze consenso a monte e a valle del sito donatore e del sito accettore, oppure una sequenza consenso del sito di biforcazione (branch-site). Una terza tipologia coinvolge mutazioni in una sequenza ESE (Exon Splicing Enhancer) o ESS (Exonic Splicing Silencer) e può essere ascritta anche alle mutazioni silenti. Infine un'ultima tipologia coinvolge mutazioni che creano nuove sequenze consenso all'interno di un introne, e in tal caso questo o sue parti possono venire incluse nel trascritto, oppure in un esone, in tal caso si verifica l'exon skipping.
- **Grandi riarrangiamenti:** Si verificano quando è la struttura del gene ad essere alterata. Ad esempio fanno parte di questo gruppo di mutazioni le delezioni o le duplicazioni geniche, in cui uno o più esoni del gene sono deleti o duplicati (44).

I geni BRCA1 e BRCA2 codificano per proteine nucleari chiamate in causa nelle vie metaboliche di riparo del danno del DNA dove interagiscono, in una complessa rete di regolazioni reciproche, l'una con l'altra, con la proteina Rad51 e con numerose altre proteine. Nello specifico le proteine BRCA1 e BRCA2 intervengono nel processo di ricombinazione omologa, meccanismo di riparazione del DNA che interviene in caso di rottura di entrambi i filamenti, garantendo così l'integrità del genoma.

2.2.3 Gene BRCA1

Il gene BRCA1 è lungo approssimativamente 80 kb. Alla sua estremità N-terminale contiene una serie di note sequenze ripetute conosciute come dominio RING, un dominio catalitico coinvolto nell'ubiquitinazione proteica e nelle interazioni tra proteine. L'interazione meglio caratterizzata di questo dominio è con BARD1, con cui forma un eterodimero. L'estremità C-terminale di BRCA1 contiene due domini

conservati (BRCT), che hanno mostrato avere attività di transattivazione stimolando la trascrizione del gene.

Il gene BRCA1 codifica per una fosfoproteina nucleare di 1863 amminoacidi che svolge un ruolo nel mantenimento della stabilità genomica, e agisce anche da oncosoppressore. La proteina codificata si aggrega con altre proteine dal ruolo di oncosoppressori, sensori di danno del DNA, e trasduttori di segnale per formare un grande complesso proteico composto da diverse subunità noto come complesso di sorveglianza del genoma associato a BRCA.

BRCA1, dunque, funziona primariamente nel mantenimento della stabilità genomica per mezzo di ruoli critici nel riparo del DNA, controllo al checkpoint del ciclo cellulare, regolazione trascrizionale, apoptosi e splicing dell'Mrna. Di conseguenza, mutazioni a carico di BRCA1 spesso portano a un difettivo riparo del DNA, all'instabilità genomica e alla sensibilità agli agenti che danneggiano il DNA.

Il danno al DNA può presentarsi come conseguenza di molteplici eventi endogeni o esogeni capaci di causare tipi diversi di danno, come la perdita, l'alchilazione o l'ossidazione di basi, o rotture della singola e della doppia elica del DNA. Il tipo di danno al DNA più pericoloso e più difficile da riparare è sicuramente la rottura della sua doppia elica. Le rotture della doppia elica del DNA possono essere riparate attraverso due principali pathways: il ricongiungimento non omologo delle estremità e la ricombinazione omologa (HR, *Homologous Recombination*). È stata descritta una serie di ruoli di BRCA nel riparo delle rotture della doppia elica del DNA mediato dalla ricombinazione omologa, dove BRCA1 esercita i suoi effetti attraverso la partecipazione in almeno quattro distinti complessi proteici.

BRCA1 è inoltre noto per il suo ruolo svolto nella regolazione della trascrizione di geni coinvolti in molti altri processi cellulari. Nonostante l'esatto ruolo meccanico di BRCA1 in molti di questi processi rimanga ancora da chiarire, è ipotizzabile che esso possa svolgere molteplici funzioni grazie all'interazione con un vasto gruppo di proteine.

Le caratteristiche più impressionanti delle cellule con gene BRCA1 deficitario sono la grave instabilità genomica e la sensibilità agli agenti genotossici. Queste cellule spesso mostrano traslocazioni cromosomiche con grandi delezioni e/o amplificazioni che coinvolgono cromosomi multipli, non omologhi (45).

2.2.4 Gene BRCA2

Il gene BRCA2 è un gene oncosoppressore anch'esso implicato nel mantenimento dell'integrità del genoma durante la proliferazione cellulare, garantita dalla corretta replicazione del DNA, dall'appropriato riparo del DNA e dalla segregazione del genoma duplicato. BRCA2 risulta importante in tutti e tre questi processi.

Il gene è composto da 27 esoni di cui l'11 è straordinariamente lungo e consiste di 8 motivi BRC ripetuti, costituiti da 70 amminoacidi.

BRCA2 svolge molteplici funzioni per tutto il ciclo cellulare. In risposta al danno del DNA, due chinasi fosforilano BRCA2 all'estremità C-terminale che regola l'associazione con Rad51. Nella fase G2, avvengono svariate fosforilazioni a livello dell'estremità C-terminale, che determinano il disassemblamento di Rad51 per l'ingresso in mitosi. BRCA2 è necessario anche per lo svolgimento ottimale della replicazione del DNA, infatti agisce in fase S, grazie anche a Rad51, proteggendo il filamento nascente dalla resezione delle nucleasi.

BRCA2 codifica per una grande proteina di 3418 amminoacidi, la cui caratteristica principale è quella di variare i suoi partners e ruoli durante le varie fasi del ciclo cellulare. Tale proteina contiene molte copie di motivi BRC, che mediano il legame alla ricombinasi Rad51, la quale lavora nel riparo del DNA.

La scoperta che BRCA2 si lega alla ricombinasi Rad51 attraverso i suoi motivi BRC conservati e anche all'estremità C-terminale ha avvalorato l'ipotesi del coinvolgimento di BRCA2 nel riparo delle rotture della doppia elica, grazie alla regolazione della formazione del filamento nucleoproteico di Rad51 nella ricombinazione omologa diretta. I motivi BRC si legano con i monomeri di Rad51 e l'estremità C-terminale, che ha funzione di connessione e stabilizzazione dell'oligomerizzazione di Rad51.

Le mutazioni di BRCA2 nelle popolazioni Islandese e Ashkenazi sono costituite generalmente da grandi delezioni risultanti nella perdita della maggior parte dell'estremità C-terminale, includendo i motivi BRC.

Questo gene è senza dubbio il più importante oncosoppressore nel mantenere intatti genoma e cromosomi, ma come BRCA2 sia regolato nei diversi stadi del ciclo cellulare e come cambi la sua localizzazione verso i siti cruciali che necessitano del suo intervento sono aspetti ancora ampiamente sconosciuti (46).

2.2.5 Modalità di trasmissione e mutazioni conosciute

Le mutazioni di questi geni si trasmettono con modalità di tipo autosomico dominante ad alta penetranza. Nel momento in cui un soggetto eredita una mutazione germinale, acquisisce un rischio, che non necessariamente corrisponderà all'insorgenza della neoplasia.

Le alterazioni a carico dei geni oncosoppressori seguono “ la teoria dei due colpi ” per cui si rende indispensabile che entrambi gli alleli di un determinato gene siano mutati affinché si manifesti l'effetto. Quando un solo allele è danneggiato (primo colpo), il secondo resta in grado di generare una proteina funzionale. Se la prima lesione genica è a carico delle cellule germinali, viene ereditata ed è presente in tutte le cellule dell'organismo. La seconda mutazione (secondo colpo), che porta alla definitiva perdita di funzione del gene oncosoppressore, avviene nelle cellule somatiche già portatrici della prima lesione (47).

Sono riportate più di 3000 differenti varianti di sequenza di BRCA1 e BRCA2 (patogeniche e non) distribuite in modo uniforme su tutta la regione codificante e nei siti di splicing di entrambi i geni. Per la maggior parte sono piccole inserzioni o delezioni che comportano un “frameshift” (delezione o inserzione di un numero di nucleotidi non divisibile per 3 che comporta lo spostamento della sequenza di lettura a valle della mutazione e quindi la codificazione di una sequenza amminoacidica non corrispondente a quella del trascritto originario), mutazioni non-senso o alterazioni del sito di splicing, che causano il termine prematuro della trascrizione proteica e quindi la produzione di una proteina tronca, non funzionale. Inoltre, risulta frequente in BRCA1 e BRCA2 la presenza di sostituzioni amminoacidiche definite “varianti non classificate” (Unclassified Variants, UCVs) poiché non è noto se queste varianti possano influenzare la funzione di entrambi i geni, a tal punto da essere delle varianti di rilevante significato clinico (48).

2.2.6 Il problema interpretativo delle varianti a significato patogenetico sconosciuto

La maggior parte delle mutazioni a carico dei geni BRCA1 e BRCA2 comprendono mutazioni frameshift, nonsense o splicing-site: dato che queste mutazioni causano la formazione di proteine tronche, la patogenicità è facilmente prevedibile.

Tuttavia, nel corso dell'analisi molecolare dei geni MMR, varianti di sequenza di significato incerto (Unclassified Variants-UV; oppure Variants of Uncertain Significance-VUS) sono di frequente identificazione.

La maggior parte delle VUS sono mutazioni missenso, ma possono includere anche varianti introniche, mutazioni silenti e piccole inserzioni o delezioni in frame.

Nel caso delle mutazioni missenso si verifica la sostituzione di una tripletta con un codone che codifica per un amminoacido diverso, che potrà avere proprietà chimico-fisiche equivalenti (neutre) o diverse. In quest'ultimo caso, la mutazione missenso potrebbe avere conseguenze patogenetiche, determinando un cambiamento nella conformazione del dominio e, di conseguenza, nell'architettura generale della struttura proteica, tale da comportare la perdita di funzione della proteina.

Il riscontro di una VUS pone importanti problemi interpretativi nel corso della consulenza genetica nelle famiglie in cui questa viene identificata. Dal punto di vista clinico infatti, è utile caratterizzare la patogenicità delle VUS per verificare la correlazione con la sindrome neoplastica e anche per valutare il rischio d'insorgenza di cancro anche ne familiari sani portatori della mutazione.

Ad oggi, molti metodi e differenti strategie di studio sono state utilizzate da diversi laboratori per classificare le VUS in varianti deleterie/ad alto rischio o neutre/a basso rischio.

Tra questi, vi sono l'analisi di co-segregazione della variante all'interno della famiglia (cioè se la mutazione è presente in diversi soggetti della stessa famiglia affetti da neoplasia BRCA-correlata, probabilmente essa è deleteria), l'influenza della mutazione sull'attività della proteina (tramite test in vitro sull'attività della proteina mutata), la conservazione aminoacidica nelle diverse specie, l'analisi di un gruppo controllo, saggi biochimico-funzionali.

Più recentemente, l'utilizzo di modelli integrati comprendenti dati epidemiologici diretti ed indiretti, unitamente a dati basati su modelli matematici, fisici e statistici, ha contribuito all'interpretazione del ruolo clinico e funzionale delle VUS.

Attualmente infatti, per cercare di capire se queste varianti siano patogene o meno, si può ricorrere alla cosiddetta analisi *in silico*, ossia all'analisi tramite l'utilizzo di programmi computerizzati (software). I software più comunemente utilizzati per l'analisi *in silico* delle mutazioni missenso sono Poly-Phen-2, SIFT, Mutation Taster e Align-GVGD. Questi programmi informatici oltre a fornire informazioni sulla

sostituzione aminoacidica, permettono di discriminare le sostituzioni amminoacidiche tollerate da quelle non tollerate ai fini della funzionalità della proteina.

In ultima analisi la definizione della rilevanza clinica delle VUS può essere effettuata utilizzando un approccio integrato di tipo bayesiano, che tiene conto dei diversi diversi parametri clinici e biologici sopracitati (49).

Al termine del processo di valutazione le VUS vengono classificate secondo il sistema standardizzato in 5 categorie, elaborato dallo IARC (Unclassified Genetic Variants Working Group), ciascuna delle quali è associata a specifiche raccomandazioni cliniche (vedi Tabella 6) (50). Bisogna però sottolineare che non sempre tutte le variabili sono disponibili e, nonostante l'utilizzo dei modelli integrati dia un notevole contributo all'interpretazione del significato clinico, non può predire la patogenicità con assoluta certezza.

Classe	Descrizione	Probabilità di essere patogenetica
5	Definitivamente Patogenetica	>0.99
4	Probabilmente Patogenetica	0.95-0.99
3	Incerta	0.05-0.949
2	Probabilmente Neutra o di scarso significato clinico	0.001-0.049
1	Definitivamente Neutra o di scarso significato clinico	<0.001

Tabella 6: Sistema elaborato dallo IARC per la classificazione delle VUS (50)

Infine criteri specifici per l'interpretazione del significato clinico delle varianti costituzionali dei geni BRCA sono stati recentemente sviluppati dall'Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles (ENIGMA) e sono disponibili sul sito Internet del consorzio (51).

2.2.7 Counselling e test genetico

La consulenza genetica deve essere considerato come il momento principale di informazione del paziente sulle possibilità di diagnosi, di prevenzione e di intervento terapeutico offerte dal test genetico. L'indagine genetica permette di identificare i pazienti portatori di mutazioni predisponenti a carico dei geni BRCA1 e BRCA2, anche

prima che la sindrome si manifesti, permettendo così una sorveglianza e un trattamento curativo dei soggetti a rischio.

2.2.8 Counselling pre-test

Il counselling genetico è rivolto, in prima istanza, al paziente che ha già sviluppato il tumore.

La consulenza con un medico oncologo/genetista prevede un incontro preliminare con il paziente, per introdurlo all'argomento del test genetico. Il primo passo risiede poi nella raccolta accurata dell'anamnesi familiare.

L'analisi della familiarità per i tumori viene realizzata mediante la costruzione dell'albero genealogico, che permette di riassumere visivamente tutte le informazioni sulla storia familiare del paziente, evidenziando eventuali familiari colpiti da tumore, il tipo di neoplasia sviluppata e l'età di insorgenza.

Nella fase pre-test viene inoltre esaminata la documentazione medica relativa alla neoplasia o dalle lesioni pre-neoplastiche da cui è affetto il probando, tra cui esami diagnostici eseguiti, tipo di intervento chirurgico a cui il probando è stato sottoposto, esame istologico della lesione, trattamenti oncologici ricevuti.

Sulla base delle informazioni mediche raccolte in merito alla diagnosi clinica e patologica dei probandi e della familiarità evidenziata dall'albero genealogico, il Medico decide quali soggetti sono candidabili ad esecuzione di test genetico.

Il medico deve inoltre esporre al paziente le finalità del test e tutte le sue implicazioni, anche psicologiche, rassicurarlo riguardo alla tutela della privacy garantendo l'assoluta segretezza sull'esito del test e raccogliere il consenso informato.

Il consenso è lo strumento attraverso cui si attua il principio etico del rispetto dell'autonomia individuale, che nel caso di qualsiasi intervento in campo genetico ne è il presupposto fondamentale.

Il paziente deve inoltre indicare se desidera o meno che il risultato del test possa essere comunicato anche ai suoi familiari (per esempio i figli) e, in caso positivo, indicarne i nomi.

In generale vengono impiegati alcuni criteri di selezione (52), tra cui i criteri di Modena (53), per selezionare le pazienti con indicazione al test, ma nello specifico, per le pazienti con tumore ovarico, a partire dal 2015, l'indicazione c'è in ogni caso e tutte le pazienti andrebbero testate, indipendentemente dalla storia familiare, qualora affette da carcinoma ovarico ad istotipo non mucinoso, secondo le recenti raccomandazioni

AIOM, SIGU, SIBIOC, SIAPEC-IAP “Raccomandazioni per l’implementazione del test BRCA nei percorsi assistenziali – terapeutici delle pazienti affette da carcinoma ovarico” (54).

Come supporto ai criteri clinici, si associa l’utilizzo di modelli informatici, che calcolano la probabilità di un soggetto di essere portatore di una mutazione. Questa valutazione viene effettuata attraverso l’utilizzo di software informatici che si basano su specifici modelli matematici.

Uno dei programmi maggiormente usato è il CancerGene con applicazione BRCAPRO. Questo software calcola, in base alla storia familiare della prima e seconda generazione, il rischio di un soggetto di essere portatore di mutazione. Per il calcolo della probabilità vengono prese in considerazione le caratteristiche autosomali dominanti dei geni, compresa la prevalenza e la penetranza, nonché le probabilità statistiche basate sui sistemi mendeliani e sul teorema di Bayes. Il risultato è espresso come valore percentuale: i soggetti con uno score maggiore del 10% sono considerati ad alto rischio. Il software BRCAPRO è strutturato sotto forma di questionario; per il probando e per ciascun parente di primo e secondo grado, vengono inserite informazioni riguardanti il sesso, l’origine etnica, l’età, l’età d’insorgenza della neoplasia mammaria e/o ovarica e l’eventuale bilateralità della neoplasia mammaria, la presenza e l’età d’insorgenza di altre neoplasie correlate. Esiste una versione italiana del programma che permette di adattare i parametri del software BRCAPRO alle caratteristiche della popolazione italiana.

Il programma, pur essendo molto utile, presenta anche dei limiti: l’impiego dei dati di prevalenza e penetranza, che potrebbero essere inaccurati rispetto alla popolazione in esame, il fatto di tenere in considerazione solo i parenti di primo e secondo grado, il fatto di prendere in esame solo i due geni per la suscettibilità al cancro conosciuto (BRCA1 e BRCA2) (55-57).

Un altro modello utilizzato è il Manchester Scoring System, che è stato elaborato partendo dal fatto che i preesistenti modelli manuali ignorano importanti informazioni riguardanti la storia familiare, mentre i software richiedono troppo dispendio di tempo. Il Manchester Scoring System è, infatti, un modello cartaceo costruito a “modo” di tabella, che considera i familiari del probando fino al terzo e quarto grado e prende in considerazione, non solo il carcinoma mammario e/o ovarico, ma anche neoplasie correlate come prostata, pancreas e carcinoma della mammella maschile. Ad ogni neoplasia viene assegnato un punteggio, che aumenta al diminuire dell’età d’insorgenza.

La somma dei punti, determina il rischio di essere portatori. Ad un punteggio pari a 10 viene correlata una probabilità del 10% per ogni gene (58).

Il test genetico può essere effettuato solo se si è raggiunta la maggior età poiché, anche in presenza di mutazioni, non si corre un rischio più elevato di ammalarsi di tumore dell'ovaio e della mammella nel corso dell'infanzia e dell'adolescenza e tra l'altro non esistono strategie di riduzione del rischio da attuare in questa fascia d'età.

2.2.9 Test genetico

Se i dati clinici e l'analisi dell'albero genealogico suggeriscono una sospetta familiarità per il tumore, il test viene proposto al probando.

Se il paziente accetta di sottoporsi all'indagine, viene prelevata una piccola quantità di sangue. Dai leucociti presenti nel sangue periferico prelevato verrà estratto il DNA.

Attraverso tecniche di biologia molecolare, viene ricercata la presenza di un'eventuale mutazione nei geni correlati alle diverse sindromi.

La metodica di laboratorio utilizzata è lo studio della sequenza del DNA previa amplificazione del DNA estratto dal campione di sangue mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Tale metodica permette di evidenziare mutazioni nella sequenza del DNA con una notevole sensibilità, anche nel caso di mutazioni molto piccole quali le mutazioni puntiformi.

Qualora ci sia un forte sospetto clinico ma il sequenziamento del DNA mediante PCR non riesca ad identificare alcuna mutazione, sarà possibile approfondire il test con ulteriori metodiche di laboratorio quali MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), in grado di rilevare ampi riarrangiamenti genici, non identificabili attraverso le tecniche di sequenziamento diretto.

2.2.10 Risposta del test

Data la sua complessità, il test genetico spesso non è semplicemente positivo o negativo.

- **Test positivo o informativo:** in caso di identificazione di una mutazione il cui significato patogenetico sia noto (ossia l'associazione con la malattia).
- **Test incerto:** in caso di identificazione di una mutazione di significato patogenetico sconosciuto, cioè non identificabile con certezza come correlata o meno alla malattia (es. VUS)

- **Test non informativo:** quando nessuna mutazione è riscontrata. Questo può essere dovuto sia ai limiti delle metodiche di analisi utilizzate (per cui la mutazione è presente ma le tecniche non riescono ad individuarla), a mutazioni presenti in geni diversi da quelli analizzati e non attualmente conosciuti, oppure alla reale assenza di mutazione.
- **Test negativo:** il vero test negativo è solo quello che non rileva mutazioni in una persona che proviene da una famiglia in cui la mutazione è presente ed è nota.

Le varianti dei geni BRCA1 e BRCA2 identificate mediante test genetico vengono definite secondo le direttive HGVS (Human Genome Variation Society) ed interpretate in accordo con i criteri di classificazione del consorzio ENIGMA (sito) e di alcuni database come il Breast Cancer Information Core (BIC), il Leiden Open Variation Database (LOVD), BRCA exchange, CIMBA (Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2) e ARUP, creati per raccogliere tutte le informazioni relative alle mutazioni di BRCA1/2 che vengono progressivamente scoperte ed interpretate (59-63)

2.2.11 Comunicazione dei risultati e counselling post-test

Nel momento della raccolta del consenso informato il paziente deve dichiarare esplicitamente se desidera conoscere i risultati del test. In questo caso il risultato viene discusso con il medico.

- **Test positivo:** se è stata riscontrata una mutazione patogenetica in uno dei geni analizzati significa che la neoplasia è verosimilmente insorta su base ereditaria. La stessa mutazione può essere presente anche negli altri familiari. Al paziente vengono presentate le prospettive terapeutiche e le indagini preventive indicate, e viene inoltre invitato a proporre ai suoi familiari la possibilità di sottoporsi all'indagine genetica. Il consenso del paziente è essenziale per poter proporre ai familiari l'esecuzione del test genetico.
- **Test non informativo:** se il test genetico non ha riscontrato mutazioni nei geni analizzati, il risultato viene definito come “non informativo”, cioè non è possibile escludere con assoluta certezza che esista un difetto su base ereditaria in un altro gene oppure che il difetto esistente non sia rilevabile con le metodiche di laboratorio attualmente in uso. In questo caso le misure di

sorveglianza e prevenzione saranno basate sulla familiarità e sul profilo di rischio del probando.

La comunicazione del risultato deve comprendere anche la proposta delle misure di prevenzione e screening consigliate al paziente ed, eventualmente, ai familiari.

Andrebbe inoltre fornito eventuale supporto psicologico, al fine di aiutare il paziente ad affrontare le implicazioni di una patologia ereditaria nelle dinamiche familiari.

2.2.12 Sorveglianza e prevenzione del carcinoma ovarico in donne con mutazione BRCA

Al fine di identificare i tumori dell'ovaio nelle sue prime fasi di sviluppo, nelle donne in cui sia stata accertata una mutazione predisponente è necessario programmare una serie di indagini cliniche e strumentali. Lo stato delle ovaie può essere valutato mediante ecografia transvaginale con cadenza semestrale affiancata dalla determinazione dei livelli di CA125. Tuttavia questi metodi di screening danno con notevole frequenza risultati ambigui e non impattano sulla mortalità.

Per questo motivo la rimozione chirurgica delle ovaie e delle tube (annessiectomia bilaterale o salpingo-ovariectomia bilaterale profilattica) è l'unico modo possibile per ridurre il rischio di sviluppare la malattia. Poiché il rischio di tumore dell'ovaio diviene significativo solo dopo i 40 anni, l'annessiectomia bilaterale profilattica viene solitamente presa in considerazione in donne che hanno già procreato o che non hanno desiderio di maternità. È sempre necessaria anche la salpingectomia. I risultati sono ad oggi molto rincuoranti: non solo il rischio di sviluppare tumore ovarico si riduce di oltre il 90%, ma anche quello di tumore mammario, che in ogni caso prevede follow-up specifico anch'esso, risulta diminuito, grazie probabilmente al minor stimolo estrogenico sulla ghiandola (64).

2.2.13 Terapie personalizzate per le pazienti BRCA mutate: PARP-inibitori

Recenti studi hanno messo a confronto popolazioni di donne con carcinoma ovarico mutate e non mutate ed hanno dimostrato che le pazienti con mutazioni presentano tassi di sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza globale maggiori rispetto a quelle senza mutazione.

Differenze rilevanti sono emerse anche per quanto riguarda la terapia: è stato osservato che la presenza di mutazione BRCA aumenta la sensibilità ai farmaci a base di platino

che possono così essere valutati come opzione terapeutica in caso di recidiva di malattia. In questo contesto pazienti con mutazione hanno risposto più frequentemente a regimi sia con Platino sia senza Platino, anche nei casi di recidiva precoce dopo trattamento primario (8,65,66).

Nuove frontiere si prospettano con la recente introduzione di una nuova categoria di farmaci, i Parp inibitori (8).

Le PARP (Poli-ADP-ribosio-polimerasi) sono una famiglia di proteine nucleari coinvolte in una serie di processi cellulari che riguardano principalmente la riparazione del DNA, la trascrizione e l'apoptosi. Le proteine PARP1 e PARP2 in particolare segnalano i danni del DNA, promuovendo la riparazione dei danni indotti da radiazioni e da agenti alchilanti monofunzionali che avvengono a carico della singola elica attraverso l'excision base repair pathway (BER) di cui fanno parte. PARP1 può avere effetti sia positivi che negativi in processi di trans-attivazione a seconda del partner considerato (p53, AP1, YY-1 e Oct-1) e agisce da co-fattore nel sistema mediato da NF-Kb. Inoltre svolge un ruolo chiave anche nell'infiammazione, durante la quale si ha la produzione di specie ossidanti che causano danni al genoma ed è direttamente coinvolto nella promozione del processo angiogenico.

In caso di difetto nella via di riparazione del DNA tramite ricombinazione omologa, come avviene in caso di mutazioni a carico di BRCA, l'inibizione di una seconda via di riparazione come quella mediata da PARP, che avviene nel caso di utilizzo di farmaci PARP inibitori, fa sì che i danni della doppia elica del DNA rimangano non-riparati e si accumulino nella cellula, con conseguente arresto della crescita cellulare e della sua divisione, fino ad arrivare alla morte delle cellule tumorali (67). Tale processo viene denominato "letalità sintetica".

Olaparib è un farmaco Parp-inibitore recentemente entrato in commercio. L'approvazione di Olaparib si è basata sui risultati dello Studio 19 di *Lederman et al.*, un trial clinico di fase II randomizzato, che ha valutato l'efficacia e la sicurezza di tale farmaco confrontato con placebo come terapia di mantenimento dopo chemioterapia a base di platino in pazienti con carcinoma ovarico sieroso di alto grado, recidivato, con recidiva platino-sensibile. Lo studio ha dimostrato che la terapia di mantenimento con Olaparib aumenta significativamente la sopravvivenza libera da progressione (PFS) rispetto al placebo in pazienti affette da carcinoma ovarico legato a mutazione BRCA germinale o somatica (mediana 11,2 vs 4,3 mesi, HR=0.18), e con una proporzione di pazienti superiore al 15% di pazienti trattate che hanno ricevuto la terapia con Olaparib

per oltre 5 anni (68,69). I risultati dello studio 19 hanno portato all'approvazione EMA ed AIFA di Olaparib, indicato come monoterapia per il trattamento di mantenimento di pazienti con

recidiva platino-sensibile di carcinoma ovarico epiteliale sieroso di alto grado, BRCA-mutato (mutazione nella linea germinale e/o mutazione somatica), che sono in risposta (risposta completa o risposta parziale) alla chemioterapia a base di platino.

Lo studio di fase III confirmatorio SOLO-2, recentemente pubblicato, ha confermato un notevole e significativo vantaggio in termini di PFS (5.5 mesi vs 19.1 mesi, HR=0.30, $p<0.0001$) nelle pazienti affette da recidiva platino-sensibile di carcinoma ovarico in risposta a platino con mutazione BRCA germinale trattate con Olaparib di mantenimento (70).

Di notevole interesse è anche la possibilità di utilizzare i farmaci PARP-inibitori anche nella pazienti senza mutazioni germinali BRCA ma con deficit del sistema di ricombinazione omologa, anche denominato fenotipo "BRCAness", che identifica un sottogruppo di pazienti con caratteristiche cliniche simili a quelle con mutazione BRCA, quali una prognosi migliore, un'ottima responsività al platino e agli agenti PARP-inibitori. Lo studio di fase II ARIEL-2 ha esaminato un algoritmo basato sullo stato mutazionale di BRCA e sulla perdita di eterozigosità (LOH, genome wide loss of heterozygosity) per predire la sensibilità al PARP-inibitore Rucaparib in 206 paziente affette da carcinoma ovarico recidivato e platino-sensibile, sieroso o endometrioidale di alto grado. Le percentuali di risposta a Rucaparib (600 mg due volte al giorno) sono state del 69% per i tumori BRCA-mutati, 39% per i tumori BRCA wild-type ed elevata LOH e 11% per i tumori BRCA wild-type e bassa LOH ($p<0.0001$) (71).

In maniera simile, in un recente studio randomizzato di fase III, 553 donne con carcinoma ovarico recidivato platino-sensibile sono state randomizzate a ricevere il PARP-inibitore Niraparib (300 mg) o placebo (una volta al giorno) come terapia di mantenimento dopo un derivato del platino. In questo studio le pazienti sono state raggruppate in base alla presenza o meno di mutazioni germinali BRCA (coorte Gbrca e coorte non- Gbrca) e in base allo stato del deficit di ricombinazione omologa (HRD) valutato con test Next-generation sequencing (NGS) su DNA estratto dal tessuto tumorale mediante la piattaforma (Myriad myChoiceTM.HRD). L'utilizzo del Niraparib si è associato ad una migliore PFS mediana in tutti i sottogruppi, con un beneficio maggiore nelle pazienti con Gbrca (21 vs 5.5 mesi, HR=0.27) rispetto sia alla coorte

non-Gbrca con HRD (12.9 mesi vs 3.8 mesi, HR=0.38) sia all'intera coorte non-Gbrca (9.3 mesi vs 3.9 mesi, HR=0.45) (72).

In conclusione, alla luce della grande differenza tra le pazienti affette da carcinoma ovarico ereditario e sporadico in termini di rischio, risposta alle terapie e sopravvivenza, le raccomandazioni che suggeriscono di proporre il test per le mutazioni germinali in BRCA1/2 a tutte le donne con diagnosi di carcinoma ovarico non-mucinoso, indipendentemente dalla storia familiare, appaiono assolutamente ragionevoli (54).

3. SCOPO DELLO STUDIO

Il nostro studio si iscrive nell'ambito della valutazione delle caratteristiche istologiche e molecolari nelle pazienti affette da carcinoma ovarico sporadico ed ereditario, dovuto cioè a mutazioni germinali a carico dei geni BRCA1 e BRCA2.

Gli obiettivi del presente studio sono stati i seguenti:

1. Determinare la tipologia e la prevalenza delle mutazioni germinali a carico dei geni BRCA1 e BRCA2 nella popolazione globale delle pazienti affette da carcinoma ovarico sottoposte a test genetico presso il Centro Regionale di Genetica Oncologica-AOU Ospedali Riuniti di Ancona, Università Politecnica delle Marche
2. Analisi delle caratteristiche istopatologiche relative all'istotipo in relazione alla presenza/assenza di mutazioni a carico di BRCA1/2
3. Analizzare caratteristiche cliniche quali l'età delle pazienti all'insorgenza della malattia e la familiarità in relazione alla presenza/assenza di mutazioni di BRCA1/2
4. Stimare il detection rate (DR) relativo al test genetico nella popolazione in oggetto

4. PAZIENTI E METODI

4.1. Selezione delle pazienti

Nel presente studio sono state inserite tutte le pazienti affette da carcinoma ovarico sottoposte a consulenza e successivo test genetico presso il Centro Regionale di Genetica Oncologica nel periodo compreso tra Giugno 1996 ed Aprile 2017. I dati necessari sono stati reperiti dalle cartelle cliniche conservate nell'archivio sito nel Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari all'interno della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università Politecnica delle Marche.

Al momento del counselling pre-test, di ogni paziente era stato ricostruito l'albero genealogico della famiglia, comprendente, quando possibile, quattro generazioni e collaterali fino al terzo grado di parentela. Le pazienti candidabili a test genetico sono state selezionate sulla base della presenza di una storia familiare suggestiva per la presenza di una forma ereditaria riconducibile a presenza di mutazioni germinali a carico dei geni BRCA1 e BRCA2 (familiarità per neoplasia mammaria/ovarica), selezionate secondo i criteri riportati in Tabella 7 (52,53). A partire dall'anno 2015, con la pubblicazione delle raccomandazioni AIOM che suggeriscono di proporre il test per le mutazioni germinali in BRCA1/2 a tutte le donne con diagnosi di carcinoma ovarico non-mucinoso non-borderline, indipendentemente dalla storia familiare, il test genetico per i geni BRCA è stato proposto a tutte le pazienti affette da carcinoma ovarico indipendentemente dalla familiarità (54).

Per meglio calcolare la probabilità di trovare la mutazione BRCA1/2 i dati sono stati inseriti in un software validato per le pazienti italiane con mutazioni BRCAPRO ITALIA. Un ulteriore strumento utilizzato è il Manchester Scoring System, uno score manuale che, estendendo l'indagine anamnestica anche ai gradi di parentela superiori al secondo e inserendo anche gli altri tumori dello spettro BRCA, consente di valutare meglio la probabilità di trovare la mutazione.

A ciascuna paziente era stato richiesto un consenso informato ed era stata garantita la riservatezza dei dati personali secondo la normativa di legge obbligatoria per i dati genetici altamente sensibili.

CRITERI DI SELEZIONE DEI PAZIENTI PER COUNSELING GENETICO SOSPETTO TUMORE EREDITARIO DELLA MAMMELLA (HBOC: Hereditary Breast Ovarian Cancer) <u>E' sufficiente soddisfare uno dei punti</u> <u>Presenza nella famiglia di:</u>
• 3 parenti di primo grado con tumore mammario indipendentemente dall'età Oppure • 2 parenti di primo grado con tumore mammario ≤ 50 anni • 2 parenti con tumore della mammella bilaterale indipendentemente dall'età • 2 parenti di primo grado, 1 con tumore mammario ≤ 50 anni, l'altra con tumore ovarico* a qualsiasi età • 2 parenti di primo grado con tumore ovarico*, a qualsiasi età Oppure • 1 caso di carcinoma mammario ≤ 30 anni, anche in assenza di familiarità. • 1 caso di carcinoma ovarico* ≤ 40 anni, anche in assenza di familiarità. • 1 caso di doppio tumore nella stessa donna (mammario + ovarico*) • 1 caso di carcinoma della mammella maschile anche in assenza di familiarità e indipendentemente dall'età. • 1 caso di carcinoma mammario TRIPLO NEGATIVO ≤ 60 anni, anche in assenza di familiarità. • 1 caso di carcinoma ovarico non-mucinoso e non-borderline, INDIPENDENTEMENTE DALLA FAMILIARITA' **
NB: valida la parentela di secondo grado se evidente trasmissione per via paterna NB: non considerare il carcinoma in situ , contare solo i casi di carcinoma infiltrante * oppure carcinoma primitivo del peritoneo o della tuba ** A partire dal 2015, in accordo con le raccomandazioni AIOM

Tabella 7: criteri di selezione per il test genetico BRCA utilizzati presso il Centro regionale di Genetica Oncologica di Ancona

4.2. Studio della sequenza dei geni BRCA1 e BRCA2

L'analisi completa della sequenza genica è stata condotta per i loci BRCA1 e BRCA2, valutando sia le regioni codificanti che i siti accettori e donatori di splicing di ciascun esone, situati nelle regioni introniche.

Per il test genetico, ciascuna paziente è stata sottoposta ad un prelievo di circa 20 ml di sangue periferico, utilizzato per estrarre DNA genomico dai linfociti. Dal DNA genomico sono stati amplificati tramite PCR (*Polymerase Chain Reaction*) i frammenti corrispondenti agli esoni di BRCA1 e BRCA2, successivamente il DNA amplificato è stato purificato e sequenziato.

4.2.1. Estrazione del DNA genomico

L'estrazione di DNA genomico dal sangue è stata realizzata con metodo cromatografico utilizzando il Kit "*Flexigene 3 ml Blood*", secondo il protocollo contenuto all'interno del kit stesso.

4.2.2. Reazione a catena della polimerasi (PCR)

La *PCR* è un metodo biochimico che permette di ottenere un numero di copie estremamente elevato di una sequenza di DNA, mediante un processo detto amplificazione. Questo richiede la conoscenza delle sequenze adiacenti alla regione da amplificare, usate per la sintesi chimica di oligonucleotidi di innesco (*primers*) dai quali la reazione ha inizio. Per l'allestimento di una PCR è necessario avere a disposizione il DNA genomico dal quale sarà amplificato il frammento di interesse, due oligonucleotidi *primers* (senso e antisenso) con sequenza complementare a parte di tale frammento, l'enzima DNA polimerasi termoresistente (*Taq polimerasi*), alcuni cofattori per il corretto funzionamento dell'enzima stesso (*Buffer* e *Magnesio Cloruro*) e deossinucleotidi liberi (*Datp*, *Dctp*, *Dgtp*, *Dttp*) per l'allungamento dei *primers*. Il tutto viene mescolato ed amplificato.

4.2.3. Purificazione dell'amplificato

Per purificare il *dsDNA* ottenuto dopo la reazione di PCR è stato utilizzato il Kit "*QIAquick spin*" seguendo il protocollo designato per la purificazione con microcentrifuga.

4.2.4 Reazione e lettura di sequenza

Per l'analisi della sequenza nucleotidica degli esoni di *BRCA1* e *BRCA2* è stato utilizzato un sequenziatore automatico *ABI PRISM 310*. Per la reazione di sequenza è necessaria una sola provetta contenente nucleotidi dideossi (ddNTP) marcati con fluorocromi.

I prodotti di reazione sono separati ed ordinati, in base alla lunghezza crescente, tramite elettroforesi su un capillare ad alta risoluzione. Nel corso dell'elettroforesi i fluorocromi sono rilevati dal laser che provoca l'emissione di una radiazione luminosa a diversa lunghezza d'onda caratteristica per ogni ddNTP fluorocromato. La lunghezza d'onda è poi rilevata da un fotomoltiplicatore (CCD camera), che produce diversi picchi di emissione corrispondenti al ddNTP fluorocromato che è stato incorporato nella catena in crescita bloccandone l'ulteriore elongazione.

L'analisi tramite computer permette di separare le diverse emissioni e di ordinarle in base al peso molecolare, così da risalire alla sequenza nucleotidica. L'elettroferogramma elaborato dal sequenziatore rappresenta la sequenza nucleotidica del DNA e si presenta sotto forma di una successione di picchi di colore diverso per ogni nucleotide.

La ricerca delle mutazioni è stata effettuata analizzando l'elettroferogramma di ogni esone (comprese le regioni contenenti i siti di *splicing* 5' e 3') e confrontandolo con la sequenza di riferimento per lo stesso esone disponibile sui database in *Internet*. Graficamente, la sostituzione di un aminoacido con un altro si presenta sotto forma di due picchi sovrapposti aventi intensità simile e quindi non confondibili con il rumore di fondo; anche i polimorfismi si presentano allo stesso modo. Le mutazioni frameshift sono invece riconoscibili per lo scorrimento della cornice di lettura.

4.2.5. MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification)

In caso di riarrangiamenti genetici di maggior entità come delezioni o inserzioni di ampie porzioni del gene, si utilizza una diversa metodica chiamata *MLPA* (Multiplex Ligation Probe Amplification) che evidenzia i grandi riarrangiamenti genici che determinano un difetto di 'dose' indicativo della presenza di una estesa delezione o di una duplicazione esonica. Questa tecnica consente talvolta l'identificazione di alterazioni di questo tipo presenti in una piccola percentuale, inferiore al 10%, dei casi risultati non informativi con la metodica standard di sequenziamento.

L'MLPA offre notevoli vantaggi all'operatore in quanto è estremamente sensibile, ha un elevato grado di riproducibilità ed è di semplice esecuzione, non necessitando dell'amplificazione della sequenza d'interesse. Infatti l'amplificazione dei vari esoni è data da un sistema combinato di sonde, specifiche per ogni esone, che ibridano il DNA target del campione. Ciò che viene amplificato non è quindi il DNA del campione, ma le sonde ibridate ad esso.

I prodotti di amplificazione risultanti vengono analizzati mediante elettroforesi capillare. Il confronto tra i picchi ottenuti dal campione ed i picchi di un campione di riferimento permette di valutare eventuali esoni con un numero di copie aberrante. La reazione avviene in un unico step e richiede esclusivamente un termociclatore ed un kit di amplificazione disponibile in commercio, contenente un mix di oligonucleotidi fluorescenti che vanno a legarsi contemporaneamente a tutti gli esoni del gene che si vuole studiare.

4.2.6. Classificazione delle mutazioni germinali di BRCA1 e BRCA2

Sulla base del loro significato patogenetico, le mutazioni individuate nei geni BRCA1 e BRCA2 sono state classificate in base al loro grado di patogenicità secondo il tipo di mutazione e secondo il sistema elaborato dallo IARC (Unclassified Genetic Variants Working Group, tabella 1) e standardizzato in 5 categorie (50, 59-63)

In base al grado di patogenicità della mutazione germinale riscontrata, lei pazienti sono state suddivise in 3 categorie:

- ***Portatrici di mutazione patogenetica:*** nel caso il test genetico abbia mostrato la presenza di una mutazione patogenetica accertata a carico dei geni BRCA
- ***Non portatrici di mutazione:*** nel caso in cui il test genetico non abbia rilevato alcuna mutazione germinale o abbia rilevato una mutazione sicuramente non patogenetica
- ***Pazienti con mutazione a significato patogenetico sconosciuto:*** nel caso in cui sia stata rilevata una variante a significato sconosciuto (VUS), il cui significato attualmente non è noto

4.2.7. Analisi statistica dei dati

Sono state analizzate tutte le mutazioni riscontrate nella popolazione in esame, distinte per BRCA1 e BRCA2, patogenetiche e non. Inoltre sono stati raccolti tutti i dati relativi alla familiarità, all'età alla diagnosi e all'esame istologico, che hanno consentito di distinguere i vari fenotipi tumorali. Questi dati sono stati poi messi in relazione tra di loro.

L'associazione tra le variabili categoriche è stata eseguita mediante Fisher Exact test per le variabili binominali e mediante test Chi-quadro per tutte le altre variabili.

Per le variabili continue è stato utilizzato il test t di Student. Per tutte le variabili esaminate è stato assunto un livello di significatività statistica pari a 0.05.

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il programma MedCalc Statistical Software version 14.10.2 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium) (73).

4.2.8. Calcolo del detection rate

È stato calcolato il detection rate (DR), cioè la probabilità di riscontrare una mutazione patogenetica BRCA nel gruppo di pazienti testate con carcinoma ovarico, con la seguente formula:

$$DR\ totale = \frac{n.pz\ con\ mut.patogenetica}{n.pz\ testate}$$

E' stato inoltre successivamente calcolato il detection rate sia per il gruppo di pazienti con carcinoma ovarico con familiarità per neoplasie dello spettro BRCA, sia per le pazienti con carcinoma ovarico e familiarità assente.

$$DR\ pz\ con\ familiarità = \frac{n.pz\ con\ mut.patogenetica\ e\ familiarità}{n.pz\ con\ familiarità}$$

$$DR\ pz\ senza\ familiarità = \frac{n.pz\ con\ mut.patogenetica\ senza\ familiarità}{n.pz\ senza\ familiarità}$$

Il detection rate delle pazienti con familiarità e senza familiarità è stato confrontato mediante test Chi-Quadro.

5. RISULTATI

5.1. Caratteristiche delle pazienti

Nel presente studio sono state incluse in totale **227 pazienti** affette da carcinoma ovarico giunte all'osservazione del Centro Regionale di Genetica Oncologica nel periodo compreso tra Giugno 1996 ed Aprile 2017.

Dato che il Centro Regionale di Genetica Oncologica a cui è stato fatto riferimento per lo studio è l'unico nella Regione Marche in cui viene eseguito il test BRCA, e quindi ad esso afferiscono tutte le pazienti della Regione, è possibile affermare che i dati raccolti sono, con buona approssimazione, rappresentativi dell'intera popolazione marchigiana delle donne con carcinoma ovarico degli ultimi 21 anni.

L'età media d'insorgenza delle neoplasie ovariche nel gruppo di pazienti considerate è risultata pari a 52,03 anni (range 16 – 83 anni).

Delle 227 pazienti testate:

- **68 (30%)** sono risultate *portatrici di una mutazione patogenetica* a carico dei geni BRCA1/2
- **35 (15,4%)** sono risultate *portatrici di mutazioni dal significato sconosciuto (VUS)*
- **124 pazienti (54,6%)** sono risultate *non portatrici di mutazione* o portatrici di una mutazione sicuramente non patogenetica

5.2. Tipologia e prevalenza delle mutazioni germinali a carico dei geni BRCA1 e BRCA2

Le mutazioni riscontrate a carico dei geni BRCA1 e BRCA2 sono state distinte in base alla loro patogenicità e in base al tipo di alterazione genica prodotta.

Complessivamente sono state identificate 68 mutazioni patogenetiche e 35 a significato sconosciuto (VUS). Da notare che una unica paziente è risultata portatrice di doppia mutazione patogenetica, una frameshift a carico di BRCA1 e 1 frameshift a carico di BRCA2.

Nelle 103 (45,4%) pazienti con esito del test positivo (68 pazienti con mutazioni patogenetiche + 35 con VUS), le mutazioni risultavano distribuite 48 a carico di BRCA1, 53 a carico di BRCA2 e 2 a carico di entrambi i geni (vedi Tabella 8).

	N° Pazienti con mutazioni BRCA1	N° Pazienti con mutazioni BRCA2	N° pazienti con mutazioni BRCA1 e BRCA2	Totale
Patogenetiche	40 (38,8%)	27 (26,2%)	1 (1,0%)	68 (66,0%)
VUS	8 (7,8%)	26 (25,2%)	1 (1%)	35 (34,0%)
Totale	48 (46,6%)	53 (51,4%)	2 (2%)	103 (100%)

Tabella 8: Distribuzione delle mutazioni BRCA tra i due geni

È stata inoltre calcolata la frequenza percentuale delle mutazioni patogenetiche e di quelle dal significato sconosciuto rispetto al totale delle mutazioni riscontrate in ciascun gene. Tra le varianti identificate, è stata riscontrata una frequenza di mutazioni patogenetiche significativamente superiore ($p=0,00012$) a carico del gene BRCA1 (83%) rispetto al gene BRCA2 (51%) (vedi Figura 2).

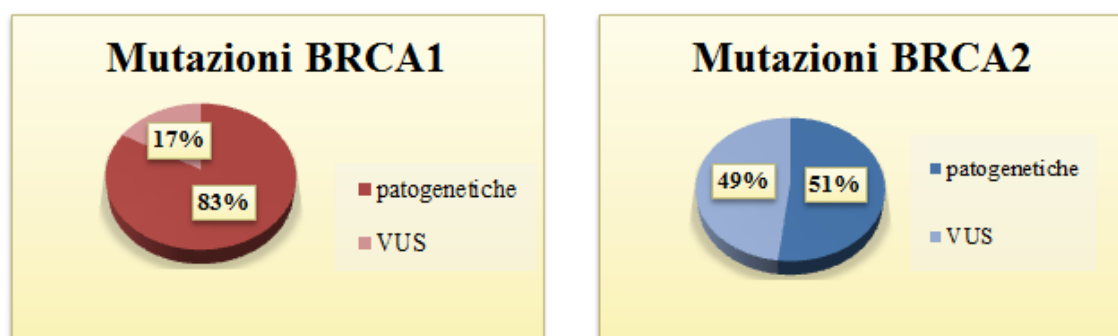


Figura 2: Diagrammi a torta raffiguranti la frequenza percentuale delle mutazioni patogenetiche e VUS nei geni BRCA1 e BRCA2

5.2.1 Mutazioni patogenetiche a carico dei geni BRCA1 e BRCA2

Le mutazioni patogenetiche identificate nella casistica sono riportate nelle Tabelle 9-10-11. Per ciascuna di esse sono state riportate il numero di pazienti in cui è stata rilevata, il tipo, la nomenclatura comprensiva dell'esone interessato, la metodica con cui è stata identificata e la frequenza con cui essa è stata rilevata nella casistica.

Tra le 68 mutazioni patogenetiche riscontrate, in 37 (54,4%) casi la mutazione rilevata non era presente in nessun'altra paziente.

Le mutazioni patogenetiche riscontrate più frequentemente all'interno della casistica sono tutte a carico di BRCA1: tra queste si segnalano un grande riarrangiamento genico con delezione degli esoni 1 e 2 (BRCA1 Del 1-2), ripetutosi 3 volte (frequenza 4,41%), tre mutazioni frameshift (c.3756_3759delGTCT; c.843_846 del CTCA; c.5263_5264 insC) anche queste ripetutesi 3 volte ciascuna, e di una mutazione missenso (300T>G, c.181T>G, Cys61Gly) a sua volta ripetutasi 3 volte.

L'esone 11 è quello maggiormente interessato da mutazioni patogenetiche sia in BRCA1 che in BRCA2. Considerando il totale delle mutazioni patogenetiche, queste ricadono nell'esone 11 per 22 volte su 40 in BRCA1 (55%), e 11 volte su 27 in BRCA2 (40,7%).

MUTAZIONI PATOGENETICHE BRCA1					
N. CASI	TIPO MUTAZIONE	NOMENCLATURA	ESONE	METODICA	FREQ. %
GRANDI RIARRANGIAMENTI					
3	riarrangiamento	Delezione esoni 1-2		MLPA	4,41
1	riarrangiamento	Delezione esoni 18-20		MLPA	1,47
1	riarrangiamento	Delezione esone 24		MLPA	1,47
FRAMESHIFT					
3	frameshift	c.3756_3759delGTCT p.Ser1253Argfs	11	SEQ	4,41
3	frameshift	c.843_846del CTCA, p. Ser281_Ser282?fs Stop297	11	SEQ	4,41
3	frameshift	5382insC, c.5263_5264insC STOP1829	20	SEQ	4,41
2	frameshift	2072insG, c.1953_1954insG, p.Lys651_652?fs, Stop672	11	SEQ	2,94
2	frameshift	(CF) 4171ins T STOP 1355	11	SEQ	2,94
2	frameshift	2072insG, c.1953_1954insG p.Lys651_Lys652?fs, Stop672	11	SEQ	2,94
2	frameshift	3901 delT STOP 1263	11	SEQ	2,94
2	frameshift	5438insC STOP 1829	21	SEQ	2,94
1	frameshift	1639del11, c.1520_1530delGACCTACATCA, p.Arg507_Ser510?fs, Stop515	11	SEQ	1,47
1	frameshift	1207 del A, Stop 373	11	SEQ	1,47
1	frameshift	1416 delG, c.1297_1297delG, p.Ala433Profs, Stop440	11	SEQ	1,47
1	frameshift	2415 (fr BR4) (CODONE 765) del AG Stop 766	11	SEQ	1,47
1	frameshift	c.2296_2297delAG, p.Ser766Terfs (2415delAG) + INTRON 19, c.5194-30T>C, IVS19-30T>C (5313-30)	11	SEQ	1,47
1	frameshift	c.2296_2297delAG, p.Ser766Terfs -Stop766	11	SEQ	1,47
1	frameshift	c.676_676delIT, p.Cys226Valfs, (795delIT) -Stop233	11	SEQ	1,47
1	frameshift	4744 del CT Stop 1572	15	SEQ	1,47

1	frameshift	482delAG, c.363_364delAG, p.Glu121_Val122?fs, Stop140	7	SEQ	1,47
NON-SENSO					
1	non-senso	5472C>T, c.5353C>T, p.Gln1785Ter	22	SEQ	1,47
1	non-senso/non-senso	BRCA1: 4236G>T, c.4117G>T, p.Glu1373Ter	12	SEQ	1,47
MISSENSO					
3	missenso	300T>G, c.181T>G, Cys61Gly	5	SEQ	2,94
1	missenso	14 4603G>T, c.4484G>T, p.Arg1495Met	14	SEQ	1,47
1	missenso	15 4755G>A, c.4636G>A, p.Asp1546Asn	15	SEQ	1,47

Tabella 9: Mutazioni patogenetiche di BRCA1 raggruppate per tipo e frequenza

MUTAZIONI PATOGENETICHE BRCA2					
N. CASI	TIPO MUTAZIONE	NOMENCLATURA	ESONE	METODICA	FREQ. %
FRAMESHIFT					
2	frameshift	3908delTG c.3680_3681delTG Stop1231 p.Leu1227Glnfs	11	SEQ	2,94
1	frameshift	6636 (fr EF) (CODONE 2136) del AAATGTT Stop 2167	11	SEQ	1,47
1	frameshift	295+1, IVS2+1G>A, c.67+1G>A	2	SEQ	1,47
1	frameshift	(fr DF2) 5776 delA (codone1850) Stop 1862		SEQ	1,47
1	frameshift	2001del4, c.1773_1776delTTAT, p.Ile591_Tyr592?fs, Stop612	10	SEQ	1,47
1	frameshift	(frCr) 4510 insT STOP 1437	11	SEQ	1,47
1	frameshift	2912delC, c.2684_2684delC, p.Ala895Valfs, Stop904	11	SEQ	1,47
1	frameshift	5945 del CT Stop 1909	11	SEQ	1,47
1	frameshift	6696delTC, c.6468_6469delTC, p.Ser2156_Gln2157Serlfs Stop2174 + BRCA2 ex11, 3744G>A, c.3516G>A, p.Ser1172	11	SEQ	1,47
1	frameshift	c.6468_6469delITC, p.Ser2156_Gln2157Serlfs, Stop2174	11	SEQ	1,47
1	frameshift	6027 del4, c.5799_5802delCCAA, p.Asn1933_Gln1934?fs Stop1961	11	SEQ	1,47
1	frameshift	7476 delCA (codone 2417) Stop 2419	14	SEQ	1,47
1	frameshift	c.7558C>T, p.Arg2520Ter (7786C>T) BRCA2, esone 11, c.1938C>T, p.Ser646= BRCA1, intron 7, c.441+15T>C, IVS7+15T>C	15	SEQ	1,47
1	frameshift	C9106T – Q2960Ter	22	SEQ	1,47
1	frameshift	9643insT, c.9414_9414insT, p.Leu3138_Pro3139?fs, Stop3148	25	SEQ	1,47
1	frameshift	886delGT c.658_659delGT, Stop223	8	SEQ	1,47
NON-SENSO					

2	non-senso	9106C>T, c.8878C>T, Q2960X, p.Gln2960Ter	22	SEQ	2,94
1	non-senso	6187 C-T Gln to Stop	11	SEQ	1,47
1	non-senso	886 del GT STOP 223		SEQ	1,47
1	non-senso	c.7480C>T, p.Arg2494Ter (7708C>T)	15	SEQ	1,47
1	non-senso	3727A>G, c.3499A>G, p.Ile1167Val	11	SEQ	1,47
SPLICING SITE					
3	Splicing-site	IVS13-2°>T c.7008-2°>T 7236-2		SEQ	4,41
SILENTE					
1	silente ma predisponente	9345G>A, c.9117G>A, p.Pro3039=	13	SEQ	1,47

Tabella 10: Mutazioni patogenetiche di BRCA2 raggruppate per tipo e frequenza

MUTAZIONI PATOGENETICHE BRCA1 E BRCA2					
N. CASI	TIPO MUTAZIONE	NOMENCLATURA	ESONE	METODICA	FREQ %
FRAMESHIFT					
1	Frameshift/ frameshift	BRCA1: c.843_846delCTCA, 962del4, p.Ser281_Ser282?fs Stop297 BRCA2: EX25, 9643insT, c.9414_9414insT, p.Leu3138_Pro3139?fs, Stop3148	BRCA1: 11 BRCA2: 25	SEQ	1,47

Tabella 11: Unica paziente con doppia mutazione patogenetica di BRCA1 e BRCA2

In totale, delle 68 pazienti risultate positive per presenza di mutazione patogenetica, nel gene BRCA1 sono state riscontrate 41 mutazioni patogenetiche (29 frameshift, 5 grandi riarrangiamenti, 5 mutazioni missenso e 2 non-senso) e nel gene BRCA2 28 mutazioni patogenetiche (18 frameshift, 6 non-senso, 3 splice-site e 1 silente patogenetica), in entrambi i casi considerando l'unica paziente portatrice di doppia mutazione patogenetica BRCA1 e BRCA2 (vedi Figure 3-4-5).

Relativamente al tipo di mutazione rilevata tra le mutazioni patogenetiche, quelle di tipo *frameshift* sono risultate le più frequenti mutazioni patogenetiche sia nel gene BRCA1 (71%) che nel BRCA2 (64%).

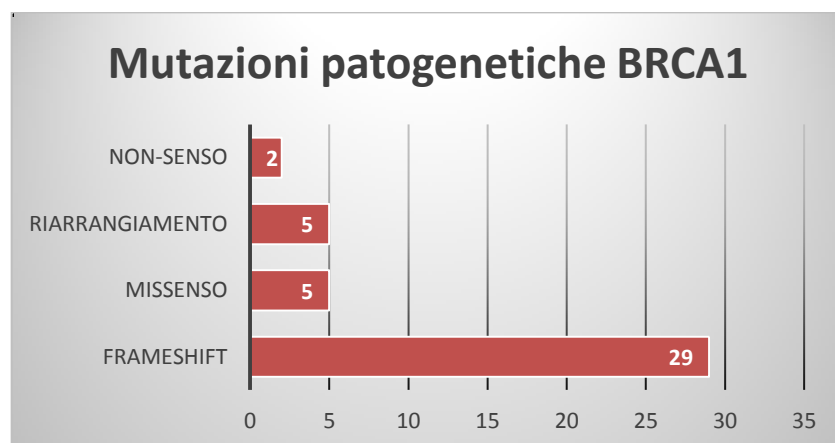


Figura 3: Istogramma delle mutazioni patogenetiche riscontrate in BRCA1 (comprensive della mutazione frameshift di BRCA1 rilevata nell'unica paziente con doppia mutazione BRCA1 e BRCA2)

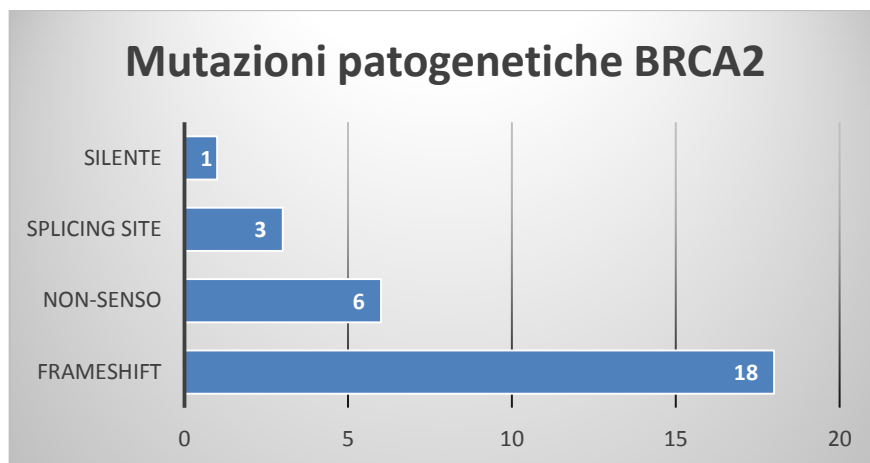


Figura 4: Istogramma delle mutazioni patogenetiche riscontrate in BRCA2 (comprensive della mutazione frameshift di BRCA2 rilevata nell'unica paziente con doppia mutazione BRCA1 e BRCA2)

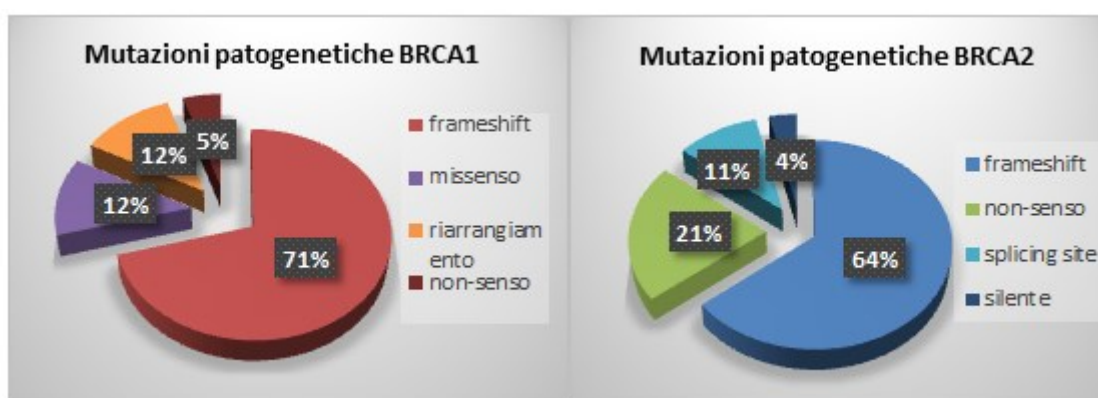


Figura 5: Diagramma a torta con la frequenza delle mutazioni patogenetiche di BRCA1 e BRCA2 (comprensive della doppia mutazione frameshift rilevata nell'unica paziente con doppia mutazione BRCA1 e BRCA2)

5.2.2. Mutazioni a significato sconosciuto (VUS) a carico dei geni BRCA1 e BRCA2

Relativamente alle mutazioni a significato sconosciuto sono state riportate la frequenza di ciascuna di esse nella casistica, il tipo di mutazione, la nomenclatura ed eventualmente l'esone interessato quando non si trattava di una variante intronica.

In entrambi i gruppi, tra le mutazioni a significato sconosciuto, sono state riscontrate solamente varianti introniche e mutazioni missenso.

In totale, delle 35 pazienti in cui è stata rilevata una VUS, nel gene BRCA1 sono state rilevate 9 VUS (6 missenso e 3 introniche) e nel gene BRCA2 sono state riscontrate 27 VUS, (13 missenso e 14 introniche), in entrambi i casi considerando anche la paziente portatrice di doppia mutazione a significato sconosciuto BRCA1 e BRCA2 (vedi Tabell 12 e Figura 6).

Come per le mutazioni patogenetiche, l'esone 11 è quello maggiormente interessato dalle mutazioni dal significato sconosciuto, infatti queste cadono nell'esone 11 nel 33,3% dei casi in BRCA1 e nel 26% dei casi in BRCA2.

N. CASI	TIPO MUTAZIONE	NOMENCLATURA	ESONE
MUTAZIONI VUS BRCA1			
1	missenso	(CF) C1225Y c.3674G>A (3792G>A)	11
1	missenso	2641G>A, c.2522G>A, p.Arg841Gln	11
1	missenso	c., p.Lys355	11
1	missenso	5401T>C, c.5282T>C, p.Phe1761Ser	21
1	missenso	710T>C, c.591C>T, p.Cys197	9
1	variante intronica	IVS 21+13G>T c.5332+13G>T (5451+13)	
1	variante intronica	intron 22, c.8953+98T>C, IVS22+98T>C, 9181+98	
1	variante intronica	intron 5, IVS5-55G>A, 332-55, c.213-55G>A	
MUTAZIONI VUS BRCA2			
1	missenso	EX 10 M415R, c.1244°>G	10
1	missenso	3744G>A Ser1172Ser	11
1	missenso	EX 11 6550C>T, c.6322C>T, p.Arg2108Cys	11
1	missenso	EX 11 L1356L 4296 G>A	11
1	missenso	EX 11 5427C>T, c.5199C>T, p.Ser1733	11
1	missenso	EX 11 c.2821G>A, p.Val941Met (3049G>A)	11
1	missenso	EX 11 c.6323G>A, p.Arg2108His (6551G>A)	11
1	missenso	EX 11 G2044A (6359G>C)	11
1	missenso	EX 15 L2512F 7762 C>T	15

1	missenso	EX 23 c.9038C>T, 9266C>T, p.Thr3013Ile	23
1	missenso	EX 27 10462°>G I3412V	27
1	missenso	BRCA2 ex26 9841GC>CT, c.9613_9614delGCinsCT	26
1	variante intronica	intron 13, 7236-62, IVS13-62°>G, c.7008-62°>G	
1	variante intronica	intron 13, 7235+113C>T, c.7007+113C>T, IVS13+113C>T	
1	variante intronica	intron 13, 7236-62, IVS13-62°>G, c.7008-62°>G BRCA2, esone 22, 9080C>G, c.8852C>G, p.Ala2951Gly	
1	variante intronica	intron 13, IVS13-62°>G, c.7008-62°>G, 7236-62	
1	variante intronica	intron 2, c.67+62T>G, IVS2+62T>G, 295+62	
1	variante intronica	intron 2, c.67+62T>G, IVS2+62T>G, 295+62 - introne 22, c.8953+98T>C, IVS22+98T>C, 9181+98	
1	variante intronica	intron 22, 9181+80, IVS22+80G>A, c.8953G>A	
1	variante intronica	intron 22, c.8953+98T>C, IVS22+98T>C, 9181+98	
1	variante intronica	intron 3, 545-102, IVS3-102T>C, c.317-102T>C	
1	variante intronica	intron 7, c.631+43G>T, IVS7+43G>T	
1	variante intronica	intron 8, IVS8-32°>G, 910-32, c.682-32°>G	
1	variante intronica	IVS13+125_133dup9, c.7007+125_7007+133dupTTTATAAAAA, 7235+125	
1	variante intronica	IVS2-7T>A, c.68-7T>A 296-7	
1	variante intronica	IVS6-89G>A, c.517-89G>A (745-89)	
MUTAZIONI VUS BRCA1 E BRCA2			
1	missenso/missenso	BRCA1: GCA-GAA (5647bp) Ala-Glu A1843E BRCA2: TAT-CAT (8986bp) Tyr-His Y2920H	BRCA1:24 BRCA2:22

Tabella 12: Mutazioni patogenetiche di BRCA2 raggruppate per tipo e frequenza

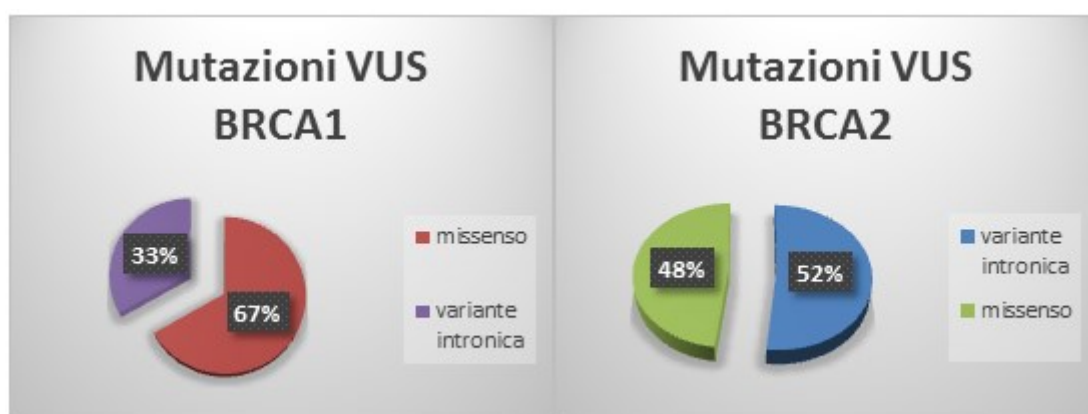


Figura 6: Diagramma a torta con la frequenza delle mutazioni VUS di BRCA1e BRCA2 (comprensive della paziente con doppia mutazione missenso BRCA1 e BRCA2)

5.3 Correlazioni tra le mutazioni di BRCA1-2 e le caratteristiche clinico-patologiche

5.3.1. Correlazione tra tipo istologico ed esito del test

L'esame istologico relativo al tipo di neoplasia ovarica era disponibile in 171 dei 227 membri totali del gruppo analizzato (75% dei casi).

Di queste 171 pazienti le informazioni relative all'esame istologico sono state raccolte e messe in relazione con l'esito del test genetico in base alla presenza/assenza di mutazioni dei geni BRCA ed eventualmente al tipo di mutazione, patogenetica o di significato sconosciuto.

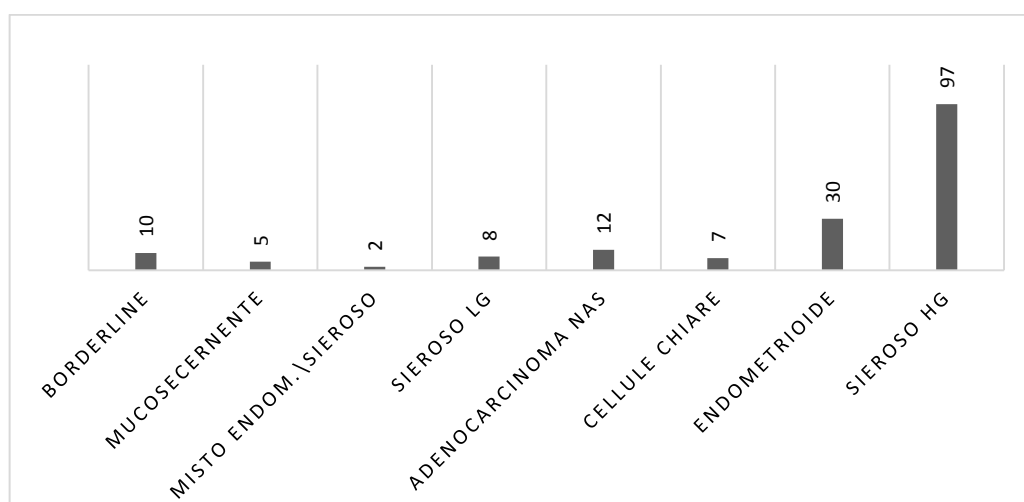


Figura 7: Istogramma raffigurante la frequenza assoluta di ciascun istotipo riscontrato

Il sieroso di alto grado è risultato il tipo istologico più rappresentato nella casistica analizzata (56,7%), seguito dall'endometrioide (17,5%) e dall' adenocarcinoma non altrimenti specificato (NAS) (7%).

Nella popolazione generale in oggetto, nei tre tipi istologici più rappresentati, il carcinoma sieroso di alto grado, l'istotipo endometrioide e l'adenocarcinoma non altrimenti specificato, la frequenza percentuale di mutazioni patogenetiche è risultata rispettivamente del 34%, 26,7%, 25% (vedi Figure 7-8).

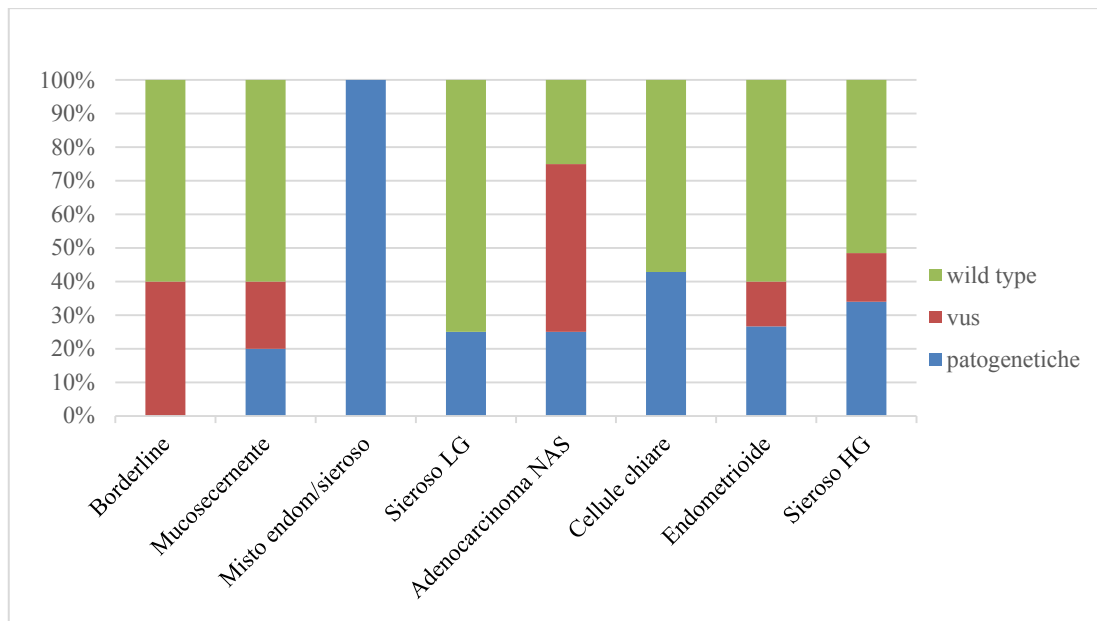


Figura 8: Grafico a barre in pila relativo alla frequenza percentuale di mutazioni patogenetiche, VUS e test wild type per ogni istotipo rilevato

Escludendo dall'analisi le pazienti con mutazioni a significato sconosciuto, in quanto il ruolo della mutazione di cui esse sono portatrici non è attualmente noto, nella tabella sottostante sono riportati i dati relativi allo stato mutazionale delle pazienti in base al tipo istologico della neoplasia da cui erano affette.

Nessuna paziente con carcinoma di tipo borderline è risultata portatrice di mutazioni patogenetiche.

Al contrario, è stata riscontrata una mutazione patogenetica (BRCA2) in uno dei quattro carcinomi mucosecipienti rilevati (vedi Tabella 13).

Non è stata osservata alcuna differenza significativa in termini di frequenza dell'istotipo sieroso di alto grado tra le pazienti BRCA-mutate e le pazienti BRCA wild-type ($p=0.45$).

	Mutaz. Patog. BRCA1	Mutaz. Patog. BRCA2	Mutaz. Patog. 1/2		Tot. Mut. Patog.	Wild type	Tot.
Sieroso Di alto grado	23 (27%)	10 (12%)	0		33 (40%)	50 (60%)	83 (100%)
Endometrioide	5 (19%)	3 (11%)	0		8 (30%)	18 (70%)	26 (100%)
Adenocarcinoma NAS	3 (50%)	0	0		3 (50%)	3 (50%)	6 (100%)
Cellule chiare	0	3 (43%)	0		3 (43%)	4 (57%)	7 (100%)
Sieroso Basso grado	0	1 (12,5%)	1 (12,5%)		2 (25%)	6 (75%)	8 (100%)
Misto endom/sieroso	1 (50%)	1 (50%)	0		2 (100%)	0	2 (100%)
Mucosecarnente	0	1 (25%)	0		1 (25%)	3 (75%)	4 (100%)
Borderline	0	0	0		0	6 (100%)	6 (100%)
Tot.	32 (23%)	19 (13,3%)	1 (0,7)		52 (37%)	90 (63%)	142 (100%)

Tabella 13: correlazione tra istotipo e presenza/assenza di mutazioni

5.3.2 Correlazione con l'età alla diagnosi

Delle 227 pazienti prese in esame dallo studio, solamente in due casi non era disponibile l'età alla diagnosi. Per quanto riguarda le restanti 225, l'età media era pari a 52,03 anni, con un range tra 16 e 83 anni.

Nella tabella sottostante sono indicate la media dell'età alla diagnosi nelle pazienti con mutazione patogenetica di BRCA1, BRCA2 e nelle pazienti wild type.

Le pazienti con VUS sono state escluse dall'analisi dato che il ruolo della mutazione di cui esse sono portatrici non è attualmente noto. Non è stata inoltre inclusa nell'analisi l'unica paziente con doppia mutazione patogenetica BRCA1 e BRCA2.

Non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa in termini di età media alla diagnosi tra pazienti con BRCA-mutate e pazienti wild-type.

Inoltre, non è stata altresì riscontrata, nell'ambito delle pazienti BRCA mutate, alcune differenza tra pazienti con mutazione BRCA1 e pazienti con mutazione BRCA2.

Tuttavia, la deviazione standard dell'età media alla diagnosi è significativamente diversa tra pazienti BRCA-mutate e pazienti wild-type, e soprattutto tra pazienti con mutazioni BRCA1 e BRCA2-mutate: questo lascia supporre che, sebbene la diagnosi non avvenga in età più precoce nelle pazienti BRCA1-mutate, tuttavia la maggior parte dei casi si concentra intorno ai 51 anni, con una variabilità più ampia nelle pazienti BRCA2-mutate e wild-type (vedi Tabella 14).

	Età media alla diagnosi	Deviazione
Mutazione BRCA	53,3 (range 29-78)	9,47
wild type	54,6 (range 16-83)	14,89
	<i>p=0.46</i>	<i>p<0.001</i>
BRCA1	51,4 (range 30-71)	8,27
BRCA2	53,1 (range 24-78)	12,73
	<i>p=0.42</i>	<i>p<0.003</i>

Tabella 14: Età media alla diagnosi nelle pazienti mutate e wild type

5.4. Calcolo del Detection rate

E' stato calcolato il detection rate (DR), cioè la probabilità di riscontrare una mutazione patogenetica BRCA per il gruppo di pazienti con carcinoma ovarico con familiarità per neoplasie dello spettro BRCA, e per le pazienti con carcinoma ovarico e familiarità assente.

Su 227 pazienti, 160 (70,5%) avevano familiarità per neoplasie dello spettro BRCA e 67 (29,5%) non l'avevano. Mentre nel primo gruppo 64 pazienti (28,2%) sono risultate portatrici di una mutazione patogenetica, nel secondo gruppo lo erano solamente 4 pazienti (1,8%) (Tabella 15).

		Familiarità		
		SI	NO	TOT.
Mutazione patogenetica	SI	64 (28,2%)	4 (1,8%)	68 (30%)
	NO	96 (42,3%)	63 (27,8%)	159 (70%)
	TOT.	160 (70,5%)	67 (29,5%)	227

Tabella 15: dati relativi a familiarità e presenza di mutazioni patogenetiche BRCA

Utilizzando i dati relativi alla presenza o meno di familiarità riassunti nella Tabella 15 è stato calcolato il detection rate (DR) nei diversi gruppi come di seguito:

$$DR\ totale = \frac{n.pz\ con\ mut.patog.}{n.pz\ testate} = 30\%$$

$$DR\ pz\ con\ familiarità = \frac{n.pz\ con\ mut.patogenetica\ e\ familiarità}{n.pz\ con\ familiarità} = 40\%$$

$$DR\ pz\ senza\ familiarità = \frac{n.pz\ con\ mut.patog.senza\ familiarità}{n.pz\ senza\ familiarità} = 6\%$$

Mediante il test del Chi Quadrato è stata dimostrata la significatività statistica di questi risultati al livello di probabilità dell'1% (p=0,0009).

6. DISCUSSIONE

Studi recenti di popolazione hanno evidenziato che le pazienti affette da carcinoma ovarico presentano una prevalenza di varianti patogenetiche costituzionali a carico dei geni BRCA >10%, indipendentemente dall'età alla diagnosi e dalla presenza di storia familiare per tumore della mammella/ovaio (8).

Il test genetico nelle pazienti con carcinoma ovarico permette di identificare i tumori associati a mutazioni di BRCA1 e 2, che presentano alcune caratteristiche cliniche e istologiche peculiari.

Le mutazioni germinali a carico dei geni BRCA1 e BRCA2 hanno un ruolo di primaria importanza come indicatori di prognosi nelle pazienti con carcinoma ovarico.

Infatti, nonostante le donne con mutazione germinale BRCA presentino un rischio estremamente elevato rispetto alla popolazione generale di sviluppare un carcinoma mammario e/o ovarico nel corso della vita, numerosi dati presenti in letteratura suggeriscono come donne BRCA-mutate con carcinoma ovarico abbiano una prognosi migliore delle donne con carcinoma ovarico non ereditario. Le prime sono caratterizzate da istologia sierosa, da più alta percentuale di risposta alla prima e alle successive linee di chemioterapia a base di platino, da più lungo intervallo libero da trattamento tra le recidive, da migliore sopravvivenza globale (74). Inoltre, è stato dimostrato come mutazioni dei geni BRCA, costituzionali o somatiche, rappresentino un biomarcatore predittivo di sensibilità al trattamento con inibitori dell'enzima PARP, che interviene nella riparazione del DNA danneggiato a singolo filamento, nelle pazienti affette da carcinoma dell'ovaio in fase avanzata. L'efficacia dei PARP-inibitori come opzione terapeutica nel carcinoma dell'ovaio si realizza attraverso un meccanismo di "letalità sintetica" in presenza di una concomitante perdita di funzione dei meccanismi di riparazione del DNA a doppio filamento mediante ricombinazione omologa (HR), nei quali le proteine BRCA1/2 svolgono un ruolo essenziale (75).

Sulla base di queste evidenze le principali linee guida nazionali ed internazionali raccomandano di proporre il test genetico a tutte le pazienti con carcinoma ovarico, così da sviluppare una linea di trattamento e follow-up specifica per il singolo caso, ed eventualmente per poter proporre strategie di sorveglianza e prevenzione anche all'interno della famiglia (54).

Il nostro studio si iscrive nell'ambito della valutazione delle caratteristiche istologiche e molecolari nelle pazienti affette da carcinoma ovarico sporadico ed ereditario, dovuto cioè a mutazioni germinali a carico dei geni BRCA1 e BRCA2, all'interno di un'ampia casistica monocentrica, rappresentata da tutte le pazienti affette da carcinoma ovarico sottoposte a consulenza e successivo test genetico presso il Centro Regionale di Genetica Oncologica di Ancona nel periodo compreso tra Giugno 1996 ed Aprile 2017. Dato che il Centro Regionale di Genetica Oncologica è l'unico nella Regione Marche in cui viene eseguito il test BRCA, è possibile affermare che i dati raccolti sono, con buona approssimazione, rappresentativi dell'intera popolazione marchigiana delle donne con carcinoma ovarico degli ultimi 21 anni.

Le mutazioni a carico dei geni BRCA1 e BRCA2 vengono distinte in sicuramente patogenetiche (che con certezza aumentano il rischio di sviluppare un tumore mammario e ovarico), a significato sconosciuto o VUS (il cui ruolo patogenetico non è attualmente noto) oppure non patogenetiche o neutre (50).

In entrambi i geni le mutazioni sono distribuite in modo eterogeneo, denotando l'assenza di "hot spot" mutazionali.

A causa delle notevoli dimensioni dei due geni in questione e dell'assenza di "hot spot", si riscontra una grande varietà di mutazioni, la cui prevalenza differisce tra le varie popolazioni. Anche nella nostra casistica, riguardante pazienti con diagnosi di carcinoma ovarico e risultate portatrici di una mutazione di BRCA1/2 dopo essersi sottoposte al test genetico, è emerso un pattern eterogeneo di mutazioni.

In totale, su 227 pazienti testate, 68 (30%) sono risultate portatrici di una mutazione patogenetica a carico dei geni BRCA1/2 e 35 (15,4%) sono risultate portatrici di mutazioni dal significato sconosciuto (VUS).

Tuttavia, dai risultati di questo studio emerge una rilevante concentrazione delle mutazioni a carico dell'esone 11 di entrambi i geni. Considerando per ciascun gene le mutazioni patogenetiche e le VUS indistintamente, nell'esone 11 di BRCA1 ne sono state riscontrate il 52,1% e nell'esone 11 di BRCA2 il 31,5%. Restringendo invece l'analisi alle sole mutazioni patogenetiche, queste ricadono nell'esone 11 nel 55% dei casi per il gene BRCA1 e nel 40,7% de casi per BRCA2.

Tale dato è coerente con quelli della letteratura, dato che in entrambi i geni l'esone 11 è estremamente lungo, e, soprattutto nel caso di BRCA2, sede di un importante dominio di legame con la proteina Rad-51 (76,77).

Le mutazioni riscontrate nella nostra casistica sono state successivamente ricercate in letteratura per valutare se la loro frequenza nella Regione Marche rispecchiasse o meno quella riportata in altri studi nel mondo.

Tra le mutazioni patogenetiche della nostra casistica, la maggior parte sono state riscontrate in una singola paziente.

Per quanto riguarda il gene BRCA1, una mutazione frameshift che nel nostro lavoro è stata rilevata 3 volte (5382incC), è stata citata anche in uno studio condotto in Brasile, in cui pure si è presentata più volte (78); tale mutazione è diffusa a livello mondiale e riportata da studi italiani e rappresenta una delle tipiche mutazioni “founder” degli Ebrei Ashkenazi (79).

Inoltre, la mutazione missenso patogenetica che nel nostro lavoro è stata osservata 3 volte (300T>G), a sua volta è stata citata per la sua frequente presentazione in diverse altre aree geografiche quali Brasile, Africa, Portogallo, Europa dell’est, è considerata una mutazione “founder” in Polonia ed è stata anche descritta in famiglie italiane di aree quali la Calabria, Modena, Centro e Sud Italia. (80-82).

Le altre mutazioni patogenetiche da noi rilevate a carico di BRCA1 non sono state ritrovate in letteratura.

Delle mutazioni di BRCA2 della nostra casistica, in due casi è stato trovato un riscontro in letteratura e in entrambi i casi si trattava di mutazioni troncanti di tipo *non-sense*: una di queste è stata da noi trovata in una sola occasione (7708C>T), ma la si ritrova citata in molti lavori in quanto si tratta probabilmente di una mutazione “founder” presente in Corea (83-85), la seconda (9106C>T) è invece citata da un articolo italiano che ne ipotizza un possibile effetto del fondatore nelle regioni nord-orientali italiane (86). Quest’ultima mutazione si è ripetuta anche nella nostra casistica per due volte.

Nel presente studio i grandi riarrangiamenti genici sono stati riscontrati in cinque casi, e tutti a carico del gene BRCA1. Anche questo dato conferma una similitudine tra le caratteristiche della popolazione marchigiana e quelle riportate in letteratura dove diversi studi confermano una maggiore prevalenza di riarrangiamenti a carico di BRCA1 piuttosto che di BRCA2 (87).

Per quanto concerne la correlazione con le caratteristiche istologiche, abbiamo rilevato la massima frequenza di mutazioni patogenetiche in pazienti con carcinoma sieroso di alto grado, anche se questa osservazione non ha raggiunto la significatività statistica, probabilmente a causa delle dimensioni limitate del campione, mentre nessuna delle

dieci pazienti con tumore borderline ha presentato mutazioni patogenetiche. Entrambi questi dati rispecchiano le evidenze ampiamente descritte in letteratura (88).

Del tutto sorprendente è stato invece il riscontro di una mutazione patogenetica in una paziente con carcinoma mucosecarnente. Si tratta di una mutazione di tipo frameshift a carico dell'esone 11 del gene BRCA2 (2136del AAATGTT, Stop 2167) non ripetutasi in nessun'altra paziente analizzata nello studio. Questo dato è fortemente in contrasto con quanto riportato in letteratura, da cui addirittura deriva l'indicazione a proporre il test BRCA a tutte le donne con tumori ovarici eccetto quelli borderline e quelli mucosecarnenti, dato che tale istotipo viene riferito come non correlato con la presenza di varianti patogenetiche di entrambi i geni BRCA (89,8).

Questo riscontro appare dunque meritevole di ulteriori approfondimenti istologici e molecolari per accertare che si tratti realmente di carcinoma mucosecarnente e per poter eventualmente studiare più approfonditamente il caso.

Per quanto riguarda le caratteristiche cliniche delle pazienti sono state analizzate età alla diagnosi e familiarità.

In contrasto con i dati presenti in letteratura, non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa in termini di età media alla diagnosi tra pazienti con BRCA-mutate e pazienti wild-type. Inoltre, non è stata altresì riscontrata, nell'ambito delle pazienti BRCA mutate, alcuna differenza tra pazienti con mutazione BRCA1 e pazienti con mutazione BRCA2.

Tuttavia, la deviazione standard dell'età media alla diagnosi è risultata significativamente diversa tra pazienti BRCA-mutate e pazienti wild-type, e soprattutto tra pazienti con mutazioni BRCA1 e BRCA2-mutate: questo lascia supporre che, sebbene la diagnosi non avvenga in età più precoce nelle pazienti BRCA1-mutate, tuttavia la maggior parte dei casi si concentra intorno ai 51 anni, con una variabilità più ampia nelle pazienti BRCA2-mutate e wild-type.

Da segnalare è anche la sovrapposizione dei nostri dati con quelli di un recente studio italiano, nello specifico piemontese, effettuato su una popolazione di 88 pazienti con carcinoma ovarico, di cui 44 BRCA mutate, in cui l'età media di insorgenza della neoplasia è risultata di 54 anni sia per le pazienti con carcinoma ovarico BRCA-mutate sia per le pazienti wild-type (90).

L'allineamento concettuale di ciò che è descritto dalla letteratura con i nostri dati ne avvalorà i risultati, benché talvolta essi non siano risultati statisticamente significativi, probabilmente a causa della piccola dimensione campionaria.

Abbiamo invece ottenuto risultati statisticamente significativi e sovrapponibili ai dati di letteratura riguardo alla familiarità delle pazienti. E' stato calcolato il detection rate relativo al test per i geni BRCA 1 e 2 sul totale delle pazienti testate, risultato pari al 30%, e nei due sottogruppi di pazienti con familiarità e senza familiarità per neoplasie dello spettro BRCA. Coloro che presentavano in famiglia neoplasie dello spettro BRCA hanno avuto un test positivo per presenza di mutazione patogenetica nel 40% dei casi contro il 6% nelle pazienti prive di familiarità. Tale differenza è risultata statisticamente significativa.

Tuttavia, anche di fronte ad una probabilità così bassa di trovare una mutazione patogenetica in assenza di familiarità significativa, il test BRCA nelle pazienti affette da carcinoma ovarico ha delle implicazioni prognostiche e terapeutiche così importanti da supportare le linee guida nazionali ed internazionali a proporre tale test a tutte le donne affette da carcinoma ovarico indipendentemente dalla familiarità.

La presenza di familiarità può essere però considerata un'indicazione a prestare particolari attenzioni in pazienti che non vogliano sottoporsi al test o che ne abbiano ottenuto un esito negativo, il che potrebbe dipendere da limiti nelle metodiche attualmente utilizzate o nelle attuali conoscenze.

In conclusione, con questo lavoro si vuole sottolineare l'importanza della conoscenza e dell'analisi sistematica dello spettro mutazionale dei geni BRCA 1 e 2 di tutte le pazienti con carcinoma ovarico nella nostra Regione con lo scopo di rendere possibili confronti tra andamenti clinico-patologici e mutazionali nel nostro territorio con ciò che accade in altre aree geografiche.

Il riscontro di parametri con lo stesso andamento in regioni diverse può infatti sottolineare la significatività, richiamare l'attenzione del clinico su aspetti altrimenti sottovalutati e stimolarne l'approfondimento. Allo stesso modo, il riscontro di dati contrastanti può spingere ad effettuare ulteriori studi che altrimenti non avrebbero luogo.

Da questo genere di studi, se eseguiti su larga scala, non è da escludere che possano emergere utili dati dalla valenza di fattori prognostici o predittivi.

7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. Jemal A, Thun MJ, Ries LAG, et al. (2008). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(23), 1672–1694.
2. I Numeri Del Cancro in Italia 2016. (2016).
3. GLOBOCAN. Estimated Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr>
4. Ledermann JA, Raja FA, Fotopoulou C, et al. (2013). Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 24.
5. AIOM. I tumori dell'ovaio. Linee Guida. (2016).
6. Song H, Cicek MS, Dicks E, et al. (2014). The contribution of deleterious germline mutations in BRCA1, BRCA2 and the mismatch repair genes to ovarian cancer in the population. *Hum Mol Genet* 23, 4703–4709.
7. Soegaard M, Kjaer SK, Cox M, et al (2008). BRCA1 and BRCA2 mutation prevalence and clinical characteristics of a population-based series of ovarian cancer cases from Denmark. *Clin Cancer Res* 14, 3761–3767.
8. Alsop K., Fereday S, Meldrum C, et al (2012). BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: A report from the Australian ovarian cancer study group. *J Clin Oncol* 30, 2654–2663.
9. Moorman PG, Havrilesky LJ, Gierisch JM, et al. (2013). Oral contraceptives and risk of ovarian cancer and breast cancer among high-risk women: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 31, 4188–4198.
10. Morch LS, Lokkegaard E, Andreassen H, et al. (2009). Hormone therapy and ovarian cancer. *Jama* 302, 298–305.
11. Sanner K, Conner P, Bergfeldt K, et al. (2009). Ovarian epithelial neoplasia after hormonal infertility treatment: long-term follow-up of a historical cohort in Sweden. *Fertil. Steril.* 91, 1152–1158.
12. Whittemore AS, Wu ML, Paffenbarger RS, et al. (1988). Personal and environmental characteristics related to epithelial ovarian cancer. II. Exposures

- to talcum powder, tobacco, alcohol, and coffee. *American Journal of Epidemiology*, 128(6), 1228–40.
13. Ritenbaugh C, Patterson RE, Chlebowski RT, et al. (2003). The women's health initiative dietary modification trial: overview and baseline characteristics of participants. *Annals of Epidemiology*, 13(9), S87–S97.
 14. Kindelberger DW, Lee Y, Miron A, et al. (2007). Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *The American Journal of Surgical Pathology*, 31(2), 161–169.
 15. Kurman RJ, Shih IM. (2010). The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer: A Proposed Unifying Theory. *The American Journal of Surgical Pathology*, 34(3), 433–443.
 16. Toyokuni S (2009). Role of iron in carcinogenesis: cancer as a ferrotoxic disease. *Cancer Sci.* 100, 9–16.
 17. Vercellini P, Crosignani P, Somigliana E, et al. (2011). The 'incessant menstruation' hypothesis: A mechanistic ovarian cancer model with implications for prevention. *Hum Reprod* 26, 2262–2273.
 18. Kaku T, Ogawa S, Kawano Y, et al. (2003) Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc.* Mar;36(1):9-17.
 19. Vang R, Shih IM, Kurman RJ. (2009) Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *AdvAnat Pathol*; 16: 267–282.
 20. Bonome T, Lee JY, Park DC et al. Expression profiling of serouslow malignant potential, low-grade, and high-grade tumors of the ovary. *Cancer Res* 2005;65: 10602–10612.
 21. Silverberg SG (2000). Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int.J.Gynecol.Pathol.*, 19(1), 7–15.
 22. Shih IM, Kurman RG (2004) Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*, 164(5): p. 1511-8.
 23. Cho KR, Shih IM. (2009). Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol* 4: p. 287-313.
 24. Kurman RJ and Shih IM. (2011) Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol* 42(7): p. 918-31.

25. Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, et al. (2009). A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 112, 40–46.
26. Bristow RE, Duska LR, Lambrou NC, et al. (2000). A model for predicting surgical outcome in patients with advanced ovarian carcinoma using computed tomography. *Cancer*, 89(7), 1532–1540.
27. De Iaco P, Musto A, Orazi L, et al. (2011). FDG-PET/CT in advanced ovarian cancer staging: value and pitfalls in detecting lesions in different abdominal and pelvic quadrants compared with laparoscopy. *Eur J Radiol*; 80(2): e98-103.
28. FIGO CANCER REPORT 2015 Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. Jonathan S. Berek, Christopher Crumb, Michael Friedlander. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 131 (2015) S111–S122.
29. Javadi S, Ganeshan DM, Qayyum A, et al. (2016). Ovarian cancer, the revised FIGO staging system, and the role of imaging. *American Journal of Roentgenology*, 206(6), 1351–1360.
30. Heintz AP, Odicino F, Maisonneuve P, et al. (2001). Carcinoma of the ovary. *J Epidemiol Biostat*, 6(1): p. 107-38
31. Vergote I, De Brabanter J, Fyles A, et al. (2001). Prognostic importance of degree of differentiation and cyst rupture in stage I invasive epithelial ovarian carcinoma. *Lancet*, 357(9251), 176–182.
32. Pisano C, Greggi S, Tambaro R, et al. (2005). Activity of chemotherapy in mucinous epithelial ovarian cancer: A retrospective study. *Anticancer Research*, 25(5), 3501–3505.
33. Bristow RE, Tomacruz RS, Armstrong DK., et al. (2002). Survival effect of maximal cytoreductive surgery for advanced ovarian carcinoma during the platinum era: A meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology*, 20(5), 1248–1259.
34. Gadducci A, Zola P, Landoni F, et al. (1995). Serum half-life of Ca125 during early chemotherapy as an independent prognostic variable for patients with advanced epithelial ovarian cancer: results of a multicentric Italian study. *Gynecol Oncol*, 58(1): p. 47-7
35. Cancer Genome Atlas Research Network. (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474(7353), 609–615.
36. Konstantinopoulos PA, Spentzos D, Karlan BY, et al. (2010). Gene expression profile of BRCAness that correlates with responsiveness to chemotherapy and

- with outcome in patients with epithelial ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(22), 3555–3561.
37. Pennington KP, Walsh T, Harrell MI, et al. (2014). Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 20(3), 764–775.
 38. Raspollini MR, Amunni G, Villanucci A, et al. (2006). COX-2 and preoperative CA-125 level are strongly correlated with survival and clinical responsiveness to chemotherapy in ovarian cancer. *Acta Obs. Gynecol Scand* 85, 493–498.
 39. Katsaros D, Cho W, Singal R, et al. (2004). Methylation of tumor suppressor gene p16 and prognosis of epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 94, 685–692.
 40. Russo A, Calò V, Bruno L, et al. (2009). *Crit Rev Oncol Hematol.* Jan;69(1):28-44.
 41. Clinical Oncology Society of Australia. Available at: <http://cancerforum.org.au/> (Accessed: 18th September 2017)
 42. <http://cancerforum.org.au>.
 43. <https://www.azfastnet.it/content>
 44. Kobayashi H, Ohno S, Sasaki Y, et al. (2013). Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (Review). *Oncology Reports*.
 45. Savage KI, Harkin DP. (2015). BRCA1, a ‘complex’ protein involved in the maintenance of genomic stability. *FEBS J.* 282, 630–646.
 46. Lee H. (2014). Cycling with BRCA2 from DNA repair to mitosis. *Exp. Cell Res.* 329, 78–84
 47. Snustad PD, Simmons MJ. *Principi di genetica* 5° edizione,
 48. Ramus SJ, Gayther SA, et al. The Contribution of BRCA1 and BRCA2 to Ovarian Cancer correspondence email Gynaecological Cancer Research Laboratory, UCL EGA Institute for Women's Health, Paul O'Gorman Building, University College London, 72 Huntley Street, London, United Kingdom
 49. Goldgar DE, Easton DF, Byrnes GB, et al; IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. (2008). Genetic evidence and integration of various data sources for classifying uncertain variants into a single model. *Hum Mutat* Nov;29(11):1265-72.

50. Plon SE, Eccles DM, Easton D, et al; IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. (2008) Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat* Nov;29(11):1282-91
51. <http://enigmaconsortium.org>
52. Thull DL, Vogel VG. (2004) Recognition and management of hereditary breast cancer syndromes. *Oncologist*; 9: 13-24.
53. Federico M, Maiorana A, Mangone L, et al. (1999) Identification of families with hereditary breast and ovarian cancer for clinical and mammographic surveillance: the Modena Study Group proposal. *Breast Cancer Res Treat.* Jun;55(3):213-21.
54. [http://www.aiom.it/professionisti/documenti-scientifici/position paper/raccomandazioni-test-brca/1,1687,1,](http://www.aiom.it/professionisti/documenti-scientifici/position-paper/raccomandazioni-test-brca/1,1687,1)
55. Iversen ES, Parmigiani G et al. (2000) Genetic susceptibility and survival: Application to breast cancer. *J. Am. Stat. Assoc.* 2000; 95: 28-42.
56. Berry DA, Iversen ES et al. (2002) BRCAPRO validation, sensitivity of genetic testing of BRCA1/BRCA2, and prevalence of other breast cancer susceptibility genes. *J Clin Oncol*; 20: 2701-2712.
57. Evans DGR, Eccles DM, et al. (2004). A new scoring system for the chances of identify a BRCA1/2 mutation outperforms existing models including BRCAPRO. *J Med Genet.* 2004; 41: 474-480.
58. Kast K, Schmutzler RK, Rhiem K, et al. (2014). Validation of the Manchester scoring system for predicting BRCA1/2 mutations in 9,390 families suspected of having hereditary breast and ovarian cancer. *Int J Cancer* 15;135(10):2352-61.
59. <http://www.HGVS.org/varnomen>
60. <https://research.nhgri.nih.gov/bic/>
61. <http://www.lovd.nl/3.0/home>
62. <http://cimba.ccge.medschl.cam.ac.uk/>
63. <http://arup.utah.edu/database/BRCA/>
64. Finch A, Beiner M, Lubinski J, et al. (2006). Salpingo-oophorectomy and the Risk of Ovarian, Fallopian Tube, and Peritoneal Cancers in Women With a BRCA1 or BRCA2 Mutation. 490, 41–42.

65. Zhong Q, Peng HL, Zhao X, et al. (2015). Effects of BRCA1- and BRCA2-related mutations on ovarian and breast cancer survival: a meta-analysis. *Clin Cancer Res.* 1;21(1):211-20
66. Dann RB, DeLoia JA, Timms KM, et al. (2012). BRCA1/2 mutations and expression: response to platinum chemotherapy in patients with advanced stage epithelial ovarian cancer *Gynecol Oncol*;125(3):677-82.
67. Gadducci A, Guerrieri ME. (2016). PARP Inhibitors in Epithelial Ovarian Cancer: State of Art and Perspectives of Clinical Research. *Anticancer Res.* 36, 2055–64
68. Ledermann J, Harter P, Gourley C, et al. (2012). Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med.* 12;366(15):1382-92.
69. Ledermann JA, Harter P, Gourley C, et al. (2016). Overall survival in patients with platinum-sensitive recurrent serous ovarian cancer receiving olaparib maintenance monotherapy: an updated analysis from a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Oncol*;17(11):1579-1589.
70. Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, et al; SOLO2/ENGOT-Ov21 investigators. (2017). Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*;18(9):1274-1284.
71. Jenner ZB, Sood AK, Coleman RL. (2016). Evaluation of rucaparib and companion diagnostics in the PARP inhibitor landscape for recurrent ovarian cancer therapy. *Future Oncol*; 12(12):1439-56.
72. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, et al; ENGOT-OV16/NOVA Investigators. (2016) Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *N Engl J Med*; 375(22):2154-2164
73. <http://www.medcalc.org>; 2014.
74. Konstantinopoulos PA, Spentzos D, Karlan BY, et al. (2010). Gene expression profile of BRCAness that correlates with responsiveness to chemotherapy and with outcome in patients with epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 28(22): p. 3555-61.

75. Wiggans AJ, Cass GK, Bryant A, et al. (2015). Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors for the treatment of ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 20;5:CD007929
76. Cao WM, Gao Y, Yang HJ, et al. (2016). Novel germline mutations and unclassified variants of BRCA1 and BRCA2 genes in Chinese women with familial breast/ovarian cancer. *BMC Cancer*;16:64.
77. Labidi-Galy SI, Olivier T, Rodrigues M, et al. (2016). Location of mutation in BRCA2 gene and survival in patients with ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2017 Oct 30.
78. de Oliveira, ES, Soares BL, Lemos S, et al. Screening of the BRCA1 gene in Brazilian patients with breast and/or ovarian cancer via high-resolution melting reaction analysis. *Fam. Cancer* 15, 173–181
79. Abeliovich D, Kaduri L, Lerer I, et al. (2016). The founder mutations 185delAG and 5382insC in BRCA1 and 6174delT in BRCA2 appear in 60% of ovarian cancer and 30% of early-onset breast cancer patients among Ashkenazi women. *Am J Hum Genet*. 1997 Mar;60(3):505-14.
80. Schayek H, De Marco L, Starinsky-Elbaz Set al. (2016). The rate of recurrent BRCA1, BRCA2, and TP53 mutations in the general population, and unselected ovarian cancer cases, in Belo Horizonte, Brazil. *Cancer Genet*. 209, 50–52
81. Janiszewska H, Haus O, Lauda-Swieciak A et al. (2003). Frequency of three BRCA1 gene founder mutations in breast/ovarian cancer families from the Pomerania-Kujawy region of Poland. *Clin. Genet*. 64, 502–508
82. Capalbo C, Ricevuto E, Vestri A, et al. (2006). BRCA1 and BRCA2 genetic testing in Italian breast and/or ovarian cancer families: mutation spectrum and prevalence and analysis of mutation prediction models. *Ann Oncol*;17 Suppl 7:vii34-40.
83. Ahn SH, Son BH, Yoon KS, et al. (2007). BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Korean breast cancer patients at high risk of carrying mutations. *Cancer Lett*. 245, 90–95
84. Seong M, Cho S, Noh DY, et al. (2009). Comprehensive mutational analysis of BRCA1/BRCA2 for Korean breast cancer patients: Evidence of a founder mutation. *Clin. Genet*. 76, 152–160.

85. Jang JH, Lee JE, Kwon MJ, et al. (2012). Spectra of BRCA1 and BRCA2 mutations in Korean patients with breast cancer: the importance of whole-gene sequencing. *J. Hum. Genet.* 57, 212–215.
86. Miolo G, Puppa LD, Santarosa M, et al. 156 (2006). Phenotypic features and genetic characterization of male breast cancer families: identification of two recurrent BRCA2 mutations in north-east of Italy. *BMC Cancer* 6.
87. Ewald IP, Ribeiro PL, Palmero EI, et al. (2009). Genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2: A literature review. *Genet. Mol. Biol.* 32, 437–446.
88. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, et al. (2001). Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 700–10.
89. Bednar EM, Oakley HD, Sun CC, et al. (2017). A universal genetic testing initiative for patients with high-grade, non-mucinous epithelial ovarian cancer and the implications for cancer treatment. *Gynecol. Oncol.* 1–6.
90. Biglia N, Sgandurra P, Bounous VE, et al. (2016). Ovarian cancer in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers: analysis of prognostic factors and survival. *Ecancermedicalsecience*;10:639.