



PAPNNext

La nuova frontiera nella diagnosi precoce del tumore all'endometrio e all'ovaio.

RELAZIONE TECNICA

Il tumore e mutazioni somatiche.

I tumori sono patologie dovute ad alterazioni genetiche in cui la componente cellulare non risponde correttamente ai fattori che normalmente ne controllano la proliferazione. Una singola alterazione genetica non è in genere sufficiente a provocare il cancro. Infatti, i tumori sono processi multifasici: la progressione neoplastica consiste in una serie successiva di alterazioni genetiche che si accumulano.

La maggior parte dei tumori è correlata in letteratura alla presenza di mutazioni geniche somatiche. Tali mutazioni somatiche si sviluppano in modo spontaneo potenzialmente in qualsiasi tipo di cellula. Queste alterazioni del DNA possono derivare da errori casuali durante la replicazione, o dall'esposizione a fattori ambientali mutageni accidentali, professionali, o dipendenti dallo stile di vita. A differenza delle varianti patogenetiche ereditabili (germline mutations) che sono presenti nella linea germinale, le mutazioni somatiche non sono trasmissibili alla progenie.

Migliaia di mutazioni somatiche, che possono influenzare l'insorgenza di un tumore, lo sviluppo di metastasi o la risposta/resistenza a un trattamento, sono state catalogate su database internazionali. L'identificazione e la comprensione di queste alterazioni del DNA nel tumore possono essere cruciali nella diagnosi del cancro e nella pianificazione del suo trattamento, dal monitoraggio della risposta alla terapia all'identificazione precoce della ripresa. Inoltre, durante la progressione di un tumore, il tessuto continua a sviluppare ulteriori nuove mutazioni e queste ultime possono influenzare la risposta agli agenti terapeutici innescando meccanismi di resistenza.

La diagnosi del cancro, richiede una serie di analisi, tra le quali la biopsia tissutale costituisce il gold standard. La strategia terapeutica contro il cancro, e il controllo della risposta terapeutica, sono convenzionalmente decisi attraverso un approccio analitico che associa la diagnostica per immagini alla caratterizzazione patologica della biopsia del tessuto.

Incidenza e mortalità dei tumori ginecologici

Nonostante i costanti progressi in campo di diagnosi precoce e trattamento, i tumori ginecologici sono responsabili di circa **25.000 decessi ogni anno** e sono la terza causa di morte correlata a tumore nelle donne negli USA¹.

I tumori ginecologici vengono diagnosticati spesso in fase già metastatica perché presentano un andamento asintomatico e a causa della scarsa sensibilità dei metodi diagnostici finora utilizzati.

Nel mondo sono previsti più di 200.000 decessi per tumori ginecologici ogni anno^{2,3}.

L'alto tasso di mortalità associato ai tumori ginecologici ha reso lo sviluppo di nuovi strumenti diagnostici un'esigenza prioritaria.

Il tumore all'ovario è meno frequente ma più letale. Spesso è diagnosticato in fase avanzata, con tasso di

sopravvivenza a 5 anni del **30%**. Sono più di 22.000 le donne colpite da tale genere di tumore negli USA, con più di 14.000 decessi ogni anno¹.

Il tumore dell'endometrio è il tumore ginecologico più comune. Sono più di 62.000 nuovi casi diagnosticati negli USA ogni anno, con più di 11.000 decessi ogni anno¹.

Il prelievo cervicale come nuovo strumento di screening oncologico molecolare

La prevenzione e la diagnosi precoce sono strumenti essenziali per diminuire la mortalità oncologica, e l'obiettivo di molti gruppi di ricerca negli ultimi anni è stato quello di sviluppare strumenti in grado di soddisfare queste esigenze.

L'introduzione degli screening cervicali mediante l'esame citologico (il Papanicolaou test, conosciuto come "Pap test") ha fortemente ridotto l'incidenza di **tumori cervicali** nella popolazione che ha aderito, permettendo diagnosi precoce e terapia chirurgica della massa oncologica e dei suoi predecessori. Purtroppo l'identificazione di cellule neoplastiche derivanti da endometrio e ovario non è comune. L'esame citologico al microscopio del campione spesso non è in grado di discriminare tali cellule da condizioni benigne o dai tumori cervicali.

Lo **screening del DNA tumorale** sul campione cervicale ha la potenzialità di aumentare anche le chance di diagnosi precoce dei tumori all'endometrio e all'ovario in donne asintomatiche. Tale screening del DNA infatti può essere utilizzato per l'identificazione di mutazioni somatiche relative a DNA tumorale rilasciato da tessuti oncologici endometriali o ovarici, oltre che cervicali.

Il test PAPnext™

PapNext™ è un test genetico di screening finalizzato al rilevamento di mutazioni somatiche utilizzando lo stesso campione prelevato per il Pap test di routine. Il test permette di identificare i tumori endometriali e ovarici in **fase precoce**, aumentando sensibilmente le chance di successo terapeutico.

PapNext™ permette di estendere le potenzialità diagnostiche del Pap test (test citologico) grazie all'introduzione di tecnologie di sequenziamento all'avanguardia, in grado di individuare mutazioni somatiche in **30 geni** comunemente mutati nei tumori ginecologici (test genetico).

L'esame impiega le più recenti innovazioni tecnologiche. Grazie alla tecnologia di sequenziamento Next Generation Sequencing (NGS) oggi è possibile individuare in modo estremamente sensibile la presenza di mutazioni somatiche anche in presenza di esigue quantità di cellule tumorali.

PAPnext™: Studi scientifici

Un recente studio⁴ ha dimostrato la sensibilità delle tecniche di sequenziamento per l'identificazione di mutazioni somatiche utili a rilevare la presenza di tumori ginecologici endometriali e ovarici durante il Pap test di routine. Quando la tecnologia di sequenziamento è stata impiegata sui campioni cervicali raccolti da donne affette da patologia, per la ricerca di mutazioni somatiche del DNA tumorale, il test ha effettivamente rivelato la presenza di tali alterazioni.

Le mutazioni sono state identificate nel **93%** delle donne con tumore **endometriale** (90% delle quali con tumori in stadio precoce) ed nel **45%** delle donne con tumore **ovarico** (**47%** delle quali con tumori in stadio precoce).

Inoltre, non sono state rilevate mutazioni in donne non affette da patologia, conferendo alla metodica un'altissima specificità (**>99.9%**)⁵.

Benefici del test PAPnext™

PapNext™ accresce il potere di diagnosi precoce rispetto al solo Pap test unendo allo screening citologico anche lo screening genetico del DNA tumorale.

PapNext™ favorisce la diagnosi in stadi non avanzati di tumori endometriali, ovarici e cervicali, stadi in cui il tumore è ancora trattabile.

Indicazioni al test PAPnext™

PapNext™ è un test progettato per la sorveglianza della popolazione ad alto rischio, quindi particolarmente adatto a (ma non solo):

- **Predisposizione genetica:** Pazienti portatrici note di mutazioni BRCA1 or BRCA2 o di mutazioni correlate a sindrome di Lynch.
- **Fattori di rischio:** Pazienti con BMI sopra l'indice di normopeso, sintomatiche, o con sanguinamenti sospetti.
- **Familiarità:** Pazienti con familiarità per tumori endometriali, ovarici o cervicali.
- **Precedenti screening positivi:** Pazienti con esiti positivi di analisi citologiche cervicali/ginecologiche precedentemente eseguite.
- **Diagnosi precoce:** Ogni paziente che desidera eseguire lo screening più approfondito oggi disponibile per migliorare le proprie *chance* di diagnosi precoce.

Tecnologia del test PAPnext™

PapNext™ è un test di screening, eseguito mediante l'utilizzo della tecnologia di sequenziamento del DNA di ultima generazione, denominata **Next Generation Sequencing (NGS)**, in grado di rilevare in modo estremamente sensibile la presenza di mutazioni somatiche nel DNA tumorale a livello di **30**

geni, comunemente mutati in tumori dell'endometrio, dell'ovario, e della cervice uterina, anche in presenza di esigue quantità di cellule tumorali. L'analisi prevede lo studio completo della regione codificante di ogni gene (**full exon sequencing**) ad alta risoluzione.

Il test si esegue su un campione di cellule cervicali prelevate mediante un tampone dal canale endocervicale. Il DNA viene isolato ed **amplificato mediante tecnica PCR**. Successivamente, mediante l'impiego di tecniche **NGS**, si sequenziano ad elevata profondità di lettura le regioni geniche elencate in Tabella 1. Le sequenze geniche ottenute vengono successivamente analizzate attraverso un'**avanzata analisi bioinformatica**, per individuare eventuali mutazioni somatiche nei geni in esame. Le mutazioni vengono interrogate mediante il **database COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutation In Cancer)** capace di associare le mutazioni patologiche utilizzando i dati presenti nelle pubblicazioni scientifiche.

Regioni geniche investigate

Il test **PapNext™** è stato progettato per il rilevamento di mutazioni somatiche a livello di **30 geni**, comunemente mutati in tumori dell'endometrio e dell'ovario, e tumori cervicali (tabella 1).

La selezione dei geni è stata eseguita a partire dal consenso scientifico attribuito ai geni inseriti nel pannello da organizzazioni come il National Comprehensive Cancer Network (NCCN)⁵⁹ e la Società Europea di Oncologia Medica (ESMO)⁶⁰. Il pannello comprende geni, regioni geniche incluse le varianti a singolo nucleotide (SNV), e inserzioni/delezioni (indels) che si sono dimostrate utili nello studio molecolare del tessuto tumorale.

Tabella 1: Geni investigati e frequenza delle mutazioni nei tumori endometriali, ovarici e cervicali*

Genes	Endometrial cancer	Ovarian cancer	Ovary Serous carcinoma	Ovary Endometrioid carcinoma	Ovary Clear cell carcinoma	Ovary Mucinous carcinoma	Cervical cancer
PTEN	37,2%	3,5%	0,0%	18,0%	4,0%	4,0%	3,9%
PIK3CA	25,1%	10,9%	2,0%	23,0%	33,0%	10,0%	11,9%
ARID1A	25,1%	9,6%	0,0%	25,0%	50,0%	0,0%	5,6%
TP53	24,4%	46,1%	66,0%	51,0%	11,0%	54,0%	5,4%
CTNNB1	17,6%	5,9%	0,0%	27,0%	3,0%	3,0%	3,0%
PIK3R1	16,5%	1,0%	0,0%	11,0%	0,0%	0,0%	2,1%
KRAS	14,9%	13,1%	6,0%	14,0%	8,0%	47,0%	5,6%
CTCF	13,5%	0,5%					1,3%
ZFH3	12,0%	1,2%					4,7%
FBXW7	11,2%	1,6%	0,0%	7,0%	6,0%	0,0%	5,9%
PPP2R1A	11,1%	2,1%	0,0%	6,0%	8,0%	2,0%	1,0%
FGFR2	10,0%	0,8%	0,0%	3,0%	0,0%	1,0%	0,9%
KMT2D	9,2%	2,5%	2,5%	0,0%	0,0%	0,0%	8,3%
KMT2C	9,1%	2,8%	2,8%	0,0%	0,0%	0,0%	8,9%
FAT1	8,8%	2,3%	2,0%	0,0%	0,0%	0,0%	4,5%
FAT4	8,3%	4,2%	4,2%	0,0%	0,0%	0,0%	5,0%
BCOR	8,2%	1,2%					3,0%
POLE	7,7%	2,9%	0,0%	18,0%	0,0%	0,0%	2,1%
ATR	6,5%	3,5%	4,0%	26,0%	0,0%	7,0%	2,1%
SMARCA4	6,2%	4,8%	0,0%	0,0%	10,0%	0,0%	3,3%
TERT	2,9%	8,1%	0,0%	0,0%	17,0%	0,0%	5,2%
CDKN2A	1,8%	5,0%	0,0%	8,0%	6,0%	19,0%	4,4%
BRAF	1,5%	6,9%	2,0%	3,0%	1,0%	11,0%	0,7%
FOXL2	0,0%	24,6%					0,2%
MED12	6,1%	0,7%					3,6%
ARID1B	5,6%	1,2%	0,0%	0,0%	9,0%	0,0%	2,0%

LRP1B	5,2%	2,7%	3,0%	0,0%	12,0%	0,0%	4,6%
SPOP	5,1%	0,7%	0,0%	10,0%	12,0%	0,0%	0,5%
BRIP1	3,9%	1,7%	0,0%	29,0%	0,0%	0,0%	1,8%
RNF43	3,1%	1,4%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,5%

* Database COSMIC

Target coverage

Si intende per **Target Coverage**, il numero medio di letture (reads) ottenute dal sequenziamento per ciascuna base nucleotidica costituente il gene. In generale, più è profonda la copertura di una regione più sensibile e affidabile è l'analisi. Per individuare varianti e mutazioni nei geni investigati, l'esame prevede una copertura di **8.000x**, per consentire il rilevamento di mutazioni di frequenza fino all'**1%**. I requisiti interni di controllo di qualità (QC) per il test **PapNext™** impongono una **copertura maggiore di 8.000x** su più del 99% delle basi target previste per l'analisi.

Frequenza dell'allele mutato (MAF)

La frequenza dell'allele mutato è la frequenza identificata nel campione riportata per le diverse mutazioni (sostituzioni, inserzioni e delezioni).

Risultati ottenibili con il test PAPnext™

Il test **PapNext™** fornisce informazioni relative alla assenza o alla presenza nel campione analizzato di mutazioni nei geni elencate in tabella 1.

Risultato "POSITIVO" – Presenza di una o più mutazioni: indica che il test ha rilevato, nel DNA estratto dal campione biologico esaminato, una o più mutazioni somatiche a livello di uno (o più) geni. Le mutazioni riscontrabili tramite il test **PapNext™** possono rientrare nelle seguenti categorie prognostiche:

con significato patologico noto;

con significato incerto in quanto non ancora note o caratterizzate dalla comunità medico-scientifica. In questo caso possono essere necessari ulteriori indagini per chiarire il significato della variante.

L'identificazione di tale/i mutazione/i può avere diverse implicazioni, in relazione alla/e variante/i rilevata/e. Il nostro genetista, in sede di consulenza genetica, spiegherà in maniera dettagliata il significato del risultato del test, indirizzando il paziente ad una successiva consulenza con lo specialista oncologo.

Risultato "NEGATIVO" - Assenza di mutazioni: indica che il test non ha rilevato, nel DNA estratto dal campione biologico esaminato, nessuna mutazione somatica.

Occasionalmente, il test potrebbe produrre un **risultato non ottimale o non conclusivo**, perché il campione non soddisfa i requisiti minimi di qualità necessari per poter considerare il risultato ottenuto ottimale e, quindi, poter procedere alla relativa emissione del referto.

Accuratezza del test PAPnext™

Le tecniche attuali di sequenziamento del DNA producono risultati con un'accuratezza superiore al 99% (sensibilità 99%; specificità 99.9%). Benché questo test sia molto accurato bisogna sempre considerare i limiti dell'esame, di seguito descritti.

Limiti del test PapNext™

- Il test **PapNext™** analizza solo mutazioni nei geni investigati. In caso di tumori che, al momento del test, non abbiano sviluppato mutazioni nei geni inclusi in tabella 1, queste ultime non saranno rilevate. E' quindi possibile che mutazioni in geni non testati da **PapNext™** possano essere causa di malattia del paziente.
- L'esame non è in grado di evidenziare:
 - mutazioni localizzate nelle regioni geniche non specificamente investigate;
 - delezioni, inversioni o duplicazioni maggiori di 25 bp.
- Un risultato **"NEGATIVO" - Assenza di mutazioni** per i geni investigati non esclude la possibilità che siano presenti mutazioni localizzate in regione del genoma non investigate dall'esame.
- Un risultato positivo deve essere interpretato nel contesto della storia clinica del paziente e correlato allo stadio della malattia, ai risultati di imaging, ai dettagli terapeutici, e ad altri dati di laboratorio.

- In alcuni casi, il risultato di un'analisi genomica può rivelare una variante o mutazione del DNA con un significato clinico non certo o determinabile in base alle attuali conoscenze medico-scientifiche.
- L'interpretazione delle varianti genetiche si basa sulle più recenti conoscenze disponibili al momento dell'analisi. Tale interpretazione potrebbe cambiare in futuro con l'acquisizione di nuove informazioni scientifiche e mediche sulla struttura del genoma ed influire sulla valutazione stessa delle varianti.
- Alcune di queste varianti potrebbero non essere ancora state identificate o validate dalla comunità scientifica e quindi non essere riportate come patogenetiche al momento dell'analisi.
- Limite intrinseco della metodologia NGS utilizzata è la mancanza di uniformità di *coverage* per ciascuna regione genica analizzata. Tale limite si traduce nella possibilità, insita nelle metodiche NGS, che specifiche mutazioni dei geni selezionati potrebbero non essere state rilevate dal test.
- Mutazioni somatiche non incluse nell'esame non saranno rilevate.
- Il test **PapNext™** non è finalizzato all'individuazione della predisposizione ereditaria allo sviluppo dei tumori, ma rileva solo le mutazioni somatiche.

Disclaimer

I dati presentati nella relazione tecnica e nei referti sono destinati all'uso esclusivo di personale sanitario qualificato. Ogni diagnosi, consulenza, o prescrizione di trattamento in relazione ai dati contenuti nella presente relazione tecnica, o nei referti, deve essere eseguita da un operatore sanitario qualificato che tenga conto della storia clinica del singolo paziente, compresi gli esiti dei altri metodi d'analisi tradizionali (es. biopsia tumorale dei tessuti e tecniche di imaging). Le informazioni contenute nei referti e nella presente relazione tecnica sono riferibili alla data in cui gli stessi sono stati emessi; si consiglia all'operatore sanitario che prende in carico il paziente di rivalutare in un eventuale futuro la situazione emersa secondo la più recente letteratura disponibile.

Bibliografia

- 1) Howlader et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2014 (National Cancer Institute, 2017).
- 2) Bray et al.. Int. J. Cancer 10.1002/ijc.27711 (2012).
- 3) International Agency for Research on Cancer, GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10; <http://globocan.iarc.fr>.
- 4) Kinde et alSci Transl Med. 2013 Jan 9;5(167):167ra45)
- 5) Wang et al. Sci Transl Med. 2018 Mar 21;10(433). pii: eaap8793.
- 6) Westin et al. 2013 Sci. Transl. Med. 5, 167ps1