Relazione Tecnica







GynoNEXT e GynoNEXT Plus

Il termine "tumore" si riferisce ad un insieme eterogeneo di malattie caratterizzate da una crescita cellulare svincolata dai normali meccanismi di controllo dell'organismo. Le cellule tumorali vivono più a lungo di quanto previsto dal normale codice genetico, generano ulteriori cellule anomale e possono, in alcuni casi, invadere (metastatizzando) i tessuti adiacenti. Alla base di questi processi alterati c'è l'accumulo di mutazioni nel DNA, ossia di alterazioni in geni implicati in diversi processi cellulari, che possono originare per svariate cause, svilupparsi in tempi molto differenti, anche sotto l'influenza di stimoli esterni ed interni. In generale, la maggior parte dei tumori è correlata alla presenza di mutazioni geniche somatiche, quindi acquisite, che si manifestano nella popolazione generale senza che ci siano elementi che facciano sospettare la presenza di un chiaro fattore predisponente su base genetica. In questo caso le mutazioni vengono acquisite in un tessuto nel corso della vita, a carico di oncogeni, oncosoppressori e geni della riparazione del DNA. Nell'ambito di una forte familiarità, in presenza di una mutazione genetica predisponente si parla di "rischio di insorgenza di tumore ereditario".

Nel tumore, l'identificazione e la comprensione di queste alterazioni possono essere cruciali e di grande aiuto nella diagnosi e nella scelta del suo trattamento, dal monitoraggio della risposta alla terapia, all'identificazione precoce di una sua eventuale ripresa. Attualmente il metodo "gold standard " per la diagnosi di cancro è rappresentato dalla biopsia tissutale, generalmente del tumore primario, che permette di ottenere la caratterizzazione del profilo mutazionale del tumore, al fine di stabilire la strategia terapeutica più indicata.

I tumori ginecologici

I tumori ginecologici sono neoplasie che interessano le donne e colpiscono soprattutto l'utero (endometrio e cervice) e l'ovaio.

In particolare, il <u>carcinoma dell'endometrio</u> costituisce attualmente la neoplasia emergente nel mondo occidentale, rappresentando l'8-10% di tutte le neoplasie femminili. In Italia, l'incidenza del carcinoma endometriale è pari al 5-6% dei tumori femminili con circa 4000 nuovi casi annui.

Il <u>tumore ovarico</u> rappresenta la principale causa di morte per tumore ginecologico e la quinta per tumore nella popolazione di sesso femminile nei Paesi sviluppati; colpisce tutte le età con maggiore frequenza tra i 50 e i 65 anni. Ogni anno si stima che siano diagnosticati in Europa 65.000 nuovi casi, dei quali quasi 5.000 in Italia. A fronte di un'incidenza relativamente bassa il tumore ovarico è gravato da un'alta mortalità.

Ad oggi, la prevenzione e la diagnosi precoce sono l'arma più efficace per limitare i danni provocati dai tumori ginecologici, e la metodologia di screening maggiormente utilizzata è il Il **pap test** (o **test di Papanikolaou**, dal cognome del medico che lo ha inventato).

Il pap test si basa sull'esame microscopico delle cellule epiteliali prelevate dalla cervice uterina della paziente e permette di monitorare e intervenire prima che l'infezione evolva in cancro.

L'attendibilità e la sensibilità del pap-test varia, dal 20 al 60%, poiché l'esame citologico non è sempre in grado di discriminare le condizioni benigne da quelle tumorali nelle loro prime fasi.

Tutto ciò obbliga a considerare più criticamente la condotta clinica in termini di screening, diagnosi, staging e protocolli terapeutici.













GynoNext e GynoNext Plus

- Il **GynoNext** è un test genetico di screening in grado di rilevare la presenza di mutazioni somatiche, in geni comunemente mutati nei tumori ginecologici utilizzando il campione prelevato per il pap-test di routine.
- Il **GynoNext Plus** permette di rilevare contemporaneamente le mutazioni somatiche e le mutazione genetiche germinali che predispongono all'insorgenza dei tumori ginecologici.

Come si esegue il test

Il test si esegue su un campione di cellule cervicale prelevato mediante tampone dal canale endocervicale per il GynoNext, mentre il GynoNext Plus necessita in aggiunta anche di un prelievo di sangue in EDTA.
Il DNA isolato da una piccola quantità di cellule viene amplificato mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) e successivamente sequenziato per rilevare l'eventuale presenza di una o più mutazioni a livello di oltre 80 geni, implicati in diversi processi cellulari, quali proliferazione, differenziamento, migrazione, trasmissione del segnale. La metodologia di sequenziamento utilizzata è il sequenziamento massivo parallelo (NGS - Next Generation Sequencing), su NovaSeq6000 (Illumina), una nuova piattaforma che consente, grazie alla produzione simultanea di miliardi di sequenze di DNA, di costruire una mappa dei geni coinvolti nei tumori ginecologici. Infine, i campioni sono analizzati in automatico mediante software dedicati e le varianti sono selezionate e classificate in base al loro significato (patogenetiche o benigne) interrogando diversi database tra cui **COSMIC** (*Catalogue Of Somatic Mutation In Cancer, etc*), capace di associare le mutazioni patogenetiche ai dati presenti in letteratura scientifica.

A chi è rivolto il test?

Il test è suggerito alle donne che rientrano nei seguenti casi:

- pazienti con familiarità per tumori endometriali, ovarici e/o cervicali
- pazienti con fattori di rischio predisponenti ai tumori ginecologici quali obesità, diabete, infezioni ricorrenti del tratto genitale (infezione da papilloma virus), sistema immunitario debilitato, età, fumo di sigaretta.
- pazienti che desiderano una più corretta e approfondita diagnosi precoce.
- pazienti positive all'analisi citologica precedentemente effettuata.

Benefici del test GynoNext

GynoNext potenzia la diagnosi precoce rispetto al solo Pap test, unendo allo screening citologico anche lo screening genetico del DNA tumorale; favorisce la diagnosi in stadi precoci e tardivi di tumori endometriali, ovarici e cervicali, o negli stadi in cui il tumore è ancora trattabile.

Il GynoNext Plus permette inoltre di rilevare eventuali mutazioni germinali che predispongono alla comparsa dei tumori ginecologici.















Risultati ottenibili con il test

Risultato "Positivo" - presenza di mutazioni: indica che il test ha rilevato la presenza di una o più mutazioni a livello di uno o più geni analizzati, coinvolti nell'insorgenza dei tumori ginecologici.

Le mutazioni riscontrabili possono essere di diverso significato prognostico:

- significato patologico noto;
- significato "incerto": indica che il test ha rilevato la presenza di mutazioni il cui significato non è noto oppure si tratta di mutazioni che non sono state ancora caratterizzate dalla comunità medico scientifica. In tal caso la paziente verrà indirizzata ad effettuare una consulenza genetica prima e oncologica poi.

Risultato "negativo" - assenza di mutazioni: indica che il test non ha rilevato la presenza di mutazioni nei geni e nelle regioni geniche analizzate. Tuttavia è importante sottolineare che un risultato negativo non significa che il paziente non presenti alcun rischio di sviluppare tumore.

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.

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 somatiche nei geni investigati, l'esame prevede una copertura media tra i 6.000X e i 10.000X.

Accuratezza del Test

Le tecniche di sequenziamento del DNA utilizzate, producono risultati con un'accuratezza prossima al 99% nel rilevare le mutazioni, ove presenti, associate ai geni analizzati. Tuttavia bisogna sempre tener conto dei limiti del test.

Limiti del test

Il GynoNext e il GynoNext Plus analizzano solo mutazioni nei geni investigati, presenti in tabella 1. In alcuni casi, il risultato dell'analisi potrebbe rilevare una variante o una mutazione del DNA con un significato clinico non noto in base alle attuali conoscenze medico-scientifiche. Alcune varianti potrebbero non essere ancora state identificate o validate come patogenetiche dalla comunità scientifica al momento dell'analisi. Tale interpretazione potrebbe cambiare in futuro con l'acquisizione di nuove conoscenze sulla struttura del genoma ed influire sulla valutazione stessa delle varianti identificate.

Il test non è in grado di evidenziare le mutazioni nelle regioni geniche non specificamente investigate, e delezioni, inversioni o duplicazioni maggiori di 25 bp.

Il test non evidenzia altre malattie genetiche o geni non specificamente investigati. L'esame inoltre non è in grado di evidenziare: \bullet mutazioni localizzate nelle regioni introniche oltre \pm 10 nucleotidi dalla giunzione esone-introne, \bullet mosaicismi della linea germinale (presenza di mutazioni nei gameti).













Tabella 1							
APC	BRIP1	EGFR	FBXW7	KMT2D	MET	PDK1	RAD51D
AKT1	CCNB2	ELF3	FGFR2	KMT2C	MLH1	PEX6	RB1
ARID1A	CDH1	ENTPD5	FOXL2	KRAS	MRE11	PIK3CA	RNF43
ARID1B	CDKN2A	EPCAM	FRMD8	LAMB1	MSH2	PIK3R1	SMARCA4
ATR	CORO2A	ERBB2	HNF1A	LIN54	MSH6	POLE	SMARCB1
BARD1	CSMD3	ERBB3	HRAS	LINC00664	NBN	PPP2R1A	SPOP
BCL2	CSNK1G1	FANCM	IMP3	LRP1B	NRAS	PMS2	STK11
BCOR	CTCF	FAT1	KIAA1324	MAPK1	PALB2	PTEN	TERT
BRAF	CTNNB1	FAT3	KIT	MAP2K6	PAX2	RAD50	TP53
BRCA1	DRAM1	FAT4	KLF5	MED12	PDGFRA	RAD51C	ZFHX3
BRCA2							

Referenze

Wang et al. Sci Transl Med. 2018 Mar 21;10(433). pii: eaap8793.

Morrison C. Financial toxicity looms as cancer combinations proliferate. Nat Biotechnol. 2015;33(8):783-784.

Garofalo et al. The impact of tumor proling approaches and genomic data strategies for cancer precision medicine. Genome Med. 2016;8(1):79. doi:10.1186/s13073-016-0333-9.

Byers H. et al. Sensitivity of BRCA1/2 testing in high-risk breast/ovarian/male breast cancer families: little contribution of comprehensive RNA/NGS panel testing. European Journal of Human Genetics (2016) 24, 1591–1597

Soukupova J et al. Validation of CZECANCA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes. PLoS One. 2018 Apr 12;13(4):e0195761.

Cabanillas R et al. A novel molecular diagnostics platform for somatic and germline precision oncology. Mol Genet Genomic Med. 2017 Apr 23;5(4):336-359

Carreras G, et al. Decessi per patologie non trasmissibili attribuibili a stili di vita in Italia e nelle regioni italiane nel 2016. Epidemiol Prev 2019; 43 (5-6): 338-346

Malvezzi M, et al. European cancer mortality predictions for the year 2011. Ann Oncol. 2011;22(4):947-56.











