



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II



Centro di Oncogenomica e Tumori Eredo-Familiari AOU Federico II

1. Il ruolo dell'Oncogenomica e delle terapie personalizzate in Oncologia	2
2. L'Oncogenomica per i tumori rari ed eredo-familiari	3
3. Il ruolo attuale e futuro dell'AOU Federico II nella gestione dei tumori rari ed eredo-familiari e nella implementazione della Medicina di Precisione.....	7
4. Piano delle attività della Piattaforma Oncogenomica	9
4.1 Diagnostica somatica.....	9
4.2 Diagnostica germline	13
5. Piano delle attività dell'UOC di Oncologia Medica	18
5.1 Strutturazione <i>multistep</i> del Counseling Oncogenetico	20
5.1.1 Fase pre-test.....	20
5.1.2 Fase post-test	21
5.2 Ruolo dello Psicologo con expertise in Psico-oncologia e tumori eredo-familiari.....	21
6. Le Biobanche e la biopsia liquida	23
7. Offerta per l'esterno	24
8. Impegno formativo dell'Università Federico II	24
9. Obiettivi e considerazioni finali	25

1. Il ruolo dell'Oncogenomica e delle terapie personalizzate in Oncologia

La branca della Medicina che si occupa dello studio del genoma umano con lo scopo specifico di ricercare metodi di prevenzione e cura dei tumori prende il nome di Oncogenomica ed abbraccia trasversalmente le discipline dell'Oncologia Medica e Molecolare, della Genetica Medica, della Biologia Molecolare, dell'Anatomia Patologica e della Patologia Clinica. L'incremento notevole delle conoscenze riguardanti la genomica e la biologia dei tumori ha portato allo sviluppo negli ultimi 15-20 anni di un numero sempre più ampio di trattamenti sistemici mirati contro specifiche alterazioni genetiche responsabili della proliferazione, crescita e sopravvivenza tumorale. A titolo di esempio si considerino i trattamenti mirati anti-HER2 nei tumori della mammella, i farmaci anti-Raf nel melanoma, gli inibitori di PARP nei tumori ovarici e mammari BRCA mutati o le terapie anti-EGFR nei tumori polmonari non a piccole cellule. Inoltre, diverse alterazioni genetiche rappresentano anche importanti fattori predittivi di risposta e/o fattori prognostici di notevole rilevanza clinica, quali la metilazione del promotore di MGMT nei glioblastomi o l'amplificazione di HER2 nei tumori mammari. La notevole rilevanza clinica delle terapie personalizzate è pienamente testimoniata dall'incremento di opzioni terapeutiche e dal miglioramento dei tassi di guarigione o dal prolungamento di sopravvivenza ottenuto in diverse neoplasie negli ultimi anni. Ad esempio, l'aggiunta dell'anticorpo monoclonale anti-HER2 trastuzumab al trattamento dei tumori mammari con iperespressione o amplificazione di HER2 in setting adiuvante ha determinato una riduzione del rischio di morte di circa il 26%¹. Negli ultimi 10 anni, nel tumore polmonare non a piccole cellule con mutazione di EGFR, almeno 8 studi di fase 3 randomizzati hanno dimostrato la superiorità degli inibitori tirosino-chinasici di EGFR nella prima linea di trattamento rispetto alla chemioterapia standard a base di platino, in termini di progressione libera da malattia, con mediane comprese tra 8.4 e 13.1 mesi per gli inibitori di EGFR, e tra 4.6 e 6.9 mesi per la chemioterapia standard². Ancora a titolo di esempio, nel melanoma B-Raf mutato la combinazione di terapia target con inibitore di Raf e MEK ha prodotto tassi di sopravvivenza globale a 3 anni del 44%³, assolutamente impensabili fino a pochi anni fa, in un tumore scarsamente chemio-responsivo quale

¹ Cameron D et al. 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *Lancet* 2017;389(10075):1195-1205. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32616-2.

² Linee guida AIOM 2017, <http://www.aiom.it/professionisti/documenti-scientifici/linee-guida/1,413,1>,

³ Long GV, Flaherty KT, Stroyakovskiy D, et al. Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Ann Oncol.* 2017; 28(7):1631-1639. doi: 10.1093/annonc/mdx176.

è il melanoma, dove la percentuale di risposte a chemioterapia standard si attesta intorno al 10-20%, con una durata generalmente breve di 3-6 mesi (⁴).

Lo sviluppo di nuove tecnologie in grado di applicare alla pratica clinica le nuove conoscenze di biologia molecolare dei tumori, il loro assetto genetico e lo studio anche di alterazioni epigenetiche e dei prodotti dell'espressione genica (RNA e proteine), ha consentito di comprendere più a fondo i meccanismi di sviluppo e crescita tumorale, oltre che di resistenza ai trattamenti. Alcuni meccanismi molecolari di resistenza sono ormai aggredibili con farmaci, come avviene per il tumore del polmone non a piccole cellule con mutazione di EGFR che sviluppa resistenza ad inibitori molecolari di prima e seconda generazione mediante lo sviluppo di una mutazione specifica (la T790M dell'EGFR), per cui è possibile impiegare un ulteriore inibitore tirosino-chinasi (AIOM). Oppure, la dimostrazione dell'assenza di meccanismi molecolari di resistenza, consente di attuare trattamenti a bersaglio mirati altrimenti inefficaci, come nel caso dei tumori del colon-retto, ove la terapia con farmaci anti-EGFR è da escludere in caso di mutazione dei geni Ras (o da attuare, in caso contrario)⁵. Oltre ad un incremento dell'efficacia dei trattamenti antitumorali e dello sviluppo di un maggior numero di opzioni terapeutiche, la conoscenza del genoma tumorale, delle sue alterazioni e delle modificazioni dei suoi prodotti di espressione in ogni singolo paziente ha consentito anche di ricorrere a terapie generalmente meno tossiche rispetto alle chemioterapie convenzionali. Tutto questo ha un impatto non solo sulla sopravvivenza dei pazienti, ma anche sulla qualità della loro vita e sul potenziale risparmio per il SSN, derivante da una minore gestione clinica di tossicità (es. minor impiego di fattori di crescita ematopoietici, minore numero di ricoveri per eventi avversi gravi).

2. L'Oncogenomica per i tumori rari ed eredo-familiari

L'Oncogenomica non riguarda solo i tumori a più alta incidenza, quali carcinomi di mammella, polmone e colon-retto, bensì si applica anche ai tumori rari.

In Europa sono convenzionalmente ritenute "rare" le neoplasie con incidenza annuale inferiore o uguale a 6/100.000. Ad oggi sono state identificate oltre 250 entità tumorali definite rare e suddivise in 12 famiglie, 10 delle quali incluse nel gruppo dei tumori rari solidi dell'adulto, che rappresentano complessivamente il 75% di tutte le diagnosi per tumore raro. Globalmente essi hanno una prevalenza europea pari al 24% di tutte le diagnosi per tumore⁶. Pur stimandosi un incremento

⁴ Bianco AR, De Placido S, Tortora G., Conte P. Core Curriculum Oncologia Clinica (II ed.). McGraw Hill Education: Milano, Italia.

⁵ Linee guida AIOM tumori del colon-retto <http://www.aiom.it/professionisti/documenti-scientifici/linee-guida/1,413,1>,

⁶ www.rarecarennet.eu

dell'incidenza di questi tumori, con approssimativamente circa 600.000 nuove diagnosi annue, la sopravvivenza dei pazienti da essi affetti rimane invariata e, per alcuni istotipi rari (mesotelioma, epiteliali ovarici rari, polmonari rari), anche alquanto scadente, con tassi di sopravvivenza a 5 anni pari a meno del 10%⁶. Complessivamente, nonostante il continuo miglioramento del *know-how* e l'elevata *expertise* dei centri di riferimento ove generalmente questi tumori vengono trattati, la gestione clinica dei pazienti affetti da tumori rari risulta estremamente complessa, anche alla luce della notevole eterogeneità istologica e molecolare di tali neoplasie, con tassi di sopravvivenza a 5 anni significativamente inferiori a quelli dei tumori ad alta incidenza (47% vs 66%)⁶. Tutto ciò è diretta conseguenza dell'assenza di opzioni terapeutiche validate e delle scarse conoscenze circa i meccanismi molecolari di crescita tumorale e di resistenza ai trattamenti. Pertanto, un significativo sforzo volto all'ampliamento delle conoscenze in ambito oncogenomico assume particolare rilevanza anche per questo tipo di neoplasie, ed in particolare nell'identificazione di alterazioni geniche (mutazioni, amplificazioni geniche, ecc.) delle cellule neoplastiche che possano fungere da potenziali target di farmaci a bersaglio molecolare e nell'identificazione di vie di segnalazione intracellulari coinvolte nei meccanismi di crescita e sopravvivenza cellulare, mediante l'analisi di espressione genica effettuata su tessuto e su cellule tumorali circolanti. Questo consentirebbe di identificare i meccanismi di sviluppo di resistenza ai trattamenti e la conseguente definizione ed applicazione di strategie di terapie personalizzate per i pazienti affetti da neoplasie rare ed ultrarare, le cui opzioni terapeutiche, al momento, restano limitate.

L'incremento delle conoscenze riguardanti la genomica tumorale ha portato ad identificare le cause o concause molecolari di una quota non trascurabile di neoplasie per la quale si riconosce una base genetica. In particolare, il 5-10% di tutti i tumori è ereditario, ovvero si sviluppa in soggetti che ereditano una mutazione genetica che predispone allo sviluppo di specifiche neoplasie nell'ambito di sindromi tumorali ben definite. Inoltre, un altro 20% di tutti i tumori viene definito come familiare. Si tratta di forme tumorali per cui si ipotizza la condivisione a livello familiare fattori ereditari, quali geni a bassa penetranza, e di fattori di rischio ambientali⁴. Sebbene la maggior parte dei tumori resti sporadica, nel loro complesso, i tumori eredo-familiari rappresentano un gruppo di neoplasie a significativo impatto sociale, in quanto molto cospicuo (circa il 25-30% di tutti i tumori) oltre che eterogeneo. Comprende, infatti, tumori di origine epiteliale e mesenchimale, fra cui carcinomi di vari organi e sarcomi, tumori encefalici ed endocrini. A titolo di esempio si riportano in tabella 1 le più frequenti sindromi tumorali eredo-familiari che generalmente richiedono un approccio oncologico specialistico per ragioni terapeutiche e/o di prevenzione. In definitiva si riconosce una base genetica causale alla base di una quota non trascurabile di tumori fra quelli a maggior incidenza e prevalenza (es. il 5-10% dei tumori della mammella, 5% dei tumori del colon-

retto), quanto di tumori ad istotipo raro (es. sarcomi dei tessuti molli, tumori cerebrali, neoplasie endocrine).

Tabella 1. Sindromi tumorali eredo-familiari più frequenti

SINDROME	PRINCIPALI TUMORI ASSOCIATI	MODALITÀ DI TRASMISSIONE	GENI RESPONSABILI
Cancro della mammella/ovaio ereditario (HBOC)	Carcinomi di mammella, ovaio, endometrio, cervice, prostata, stomaco, colon, pancreas, vie biliari, melanoma	Autosomica dominante	BRCA 1 e 2
Li-Fraumeni	Sarcomi dei tessuti molli, osteosarcoma, leucemia, tumori dell'encefalo (astrocitoma, glioblastoma, medulloblastoma, tumore dei plessi corioidei), carcinoma polmonare bronciolo-alveolare, carcinomi di mammella e surrene	Autosomica dominante	TP53
Sindromi tumorali amartomatose legate a PTEN (PHTS)	Carcinomi della mammella, tiroide, endometrio, rene, stomaco, colon-retto e sistema nervoso	Autosomica dominante	PTEN
Poliposi adenomatosa familiare (FAP)	carcinomi del colon, tiroidei, duodenali, cerebrali, epatoblastomi, osteomi, tumori desmoidi,	Autosomica dominante	APC
Tumore del colon-retto ereditario non poliposico (HNPCC)	Carcinomi di colon, endometrio, ovaio, vescica, pelvi renale, uretere, pancreas, stomaco, piccolo intestino, vie biliari	Autosomica dominante	MSH2, MLH1 e 6, PMS2
Poliposi adenomatosa Familiare MUTYH-associata (MAP)	tumori del colon-retto, tiroide e duodeno	Autosomica recessiva	MUTYH
Sindrome di Peutz-Jeghers (PJS)	Carcinomi della mammella, colon-retto, pancreas, stomaco, ovario, polmone, piccolo intestino, utero/cervice uterina, testicoli.	Autosomica dominante	STK11
Sindrome poliposica infantile e giovanile (JPS)	Tumori del colon-retto, stomaco, pancreas e piccolo intestino	Autosomica dominante	SMAD4/BMPR1A
Tumore gastrico diffuso ereditario (HDGC)	Carcinoma gastrico e lobulare della mammella	Autosomica dominante	CDH1
Melanoma ereditario	Melanoma, carcinoma del pancreas	Autosomica dominante	CDKN2A e CDK4
Tumore della prostata ereditario	Carcinoma della prostata	Autosomica dominante	HPC1 e 2, PCAP, PCBC, PRCA
		X-linked	HPCX

Neurofibromatosi di tipo 1	Neurofibromi cutanei, glioma delle vie ottiche, schwannoma maligno, feocromocitoma, GIST, leucemie, mielodisplasie, astrocitoma, melanoma, carcinoma della mammella	Autosomica dominante	NF1
MEN1	Paratiroidi, tiroide, ipofisi, carcinoma del pancreas	Autosomica dominante	MEN
MEN2	Paratiroidi, tiroide (midollare), feocromocitoma	Autosomica dominante	RET

Peraltro, una conoscenza più approfondita dei meccanismi genetici alla base dei tumori eredo-familiari ha consentito anche di comprendere meglio il ruolo di analoghe alterazioni genetiche somatiche, ovvero non ereditarie, che concorrono, nei tumori sporadici (la maggior parte), ad attivare e/o promuovere il processo di tumorigenesi (es. mutazione di APC nei tumori del colon-retto) e/o lo sviluppo di meccanismi di resistenza (es. mutazione di PTEN in tumori mammari ormonoresponsivi) o suscettibilità a farmaci antineoplastici (es. mutazione di BRCA 1 e 2 in tumori di mammella ed ovaio). In definitiva, le alterazioni genetiche tumorali somatiche, assumono anzitutto una rilevanza cruciale per la personalizzazione delle cure, così come le alterazioni genetiche germinali, dunque ereditarie, sono cruciali ai fini della diagnostica di sindromi tumorali eredo-familiari e per l'impostazione successiva di adeguati percorsi di follow-up clinico strumentale e di prevenzione, anche eventualmente chirurgica, così come per l'impostazione di terapie a bersaglio molecolare mirate sulla mutazione. Ad oggi sono sempre più numerose le terapie a bersaglio molecolare prescrivibili grazie ad analisi oncogenomiche ed indispensabili per consentire adeguati percorsi di cura. In tabella 2 si riportano i trattamenti attualmente approvati in Italia che si basano sulla individuazione di specifiche alterazioni genetiche tumorali somatiche o individuate sulla linea germinale. Molti altri trattamenti target sono inoltre già disponibili negli USA e si presume lo saranno nei prossimi anni anche in Europa.

Tabella 2. Principali geni per cui è necessario richiedere l'analisi mutazionale al fine di prescrivere farmaci target.

TUMORE SOLIDO	GENI DI CUI RILEVARE ALTERAZIONI O ESPRESSIONE ABERRANTE
Mammella, stomaco	HER2
Mammella	HER2
Mammella	HER2
Mammella	HER2
Ovaio	BRCA 1 e 2

Tumore del polmone non a piccole cellule	EGFR
Tumore del polmone non a piccole cellule con mutazione T790M di EGFR	EGFR (T790M)
Tumore del polmone non a piccole cellule	ALK
Tumore del polmone non a piccole cellule, in progressione da Crizotinib	ALK
GIST, melanoma	c-Kit (off-label per melanoma), PDGFRA (solo GIST)
Colon-retto	Ras
Melanoma	B-Raf, N-Ras

3. Il ruolo attuale e futuro dell'AOU Federico II nella gestione dei tumori rari ed eredo-familiari e nella implementazione della Medicina di Precisione

L'AOU Federico II è sede di uno dei Centri Oncologici di Riferimento Polispecialistici Universitari (CORPUS) della Rete Oncologica Campana, come da DCA 98/2016. La presa in carico dei pazienti oncologici avviene da parte degli specialisti afferenti ai Gruppi Oncologici Multidisciplinari (GOM) patologia-specifici e la supervisione dei percorsi diagnostico-terapeutici assistenziali (PDTA) è affidata agli specialisti Oncologi che operano nell'Unità Operativa Complessa (UOC) di Oncologia Medica, incardinata nel Dipartimento Assistenziale Integrato (DAI) di Onco-Ematologia, Diagnostica per Immagini e Morfologica e Medicina Legale (Dir. Prof. Sabino De Placido). Nell'ambito dell'UOC di Oncologia Medica, è attivo un servizio ambulatoriale dedicato di Counseling Oncogenetico deputato all'identificazione dei pazienti con tumori eredo-familiari e dei familiari sani ad alto rischio oncologico, e di un servizio ambulatoriale di *follow-up* per soggetti con diagnosi o ad alto rischio di tumori eredo-familiari, che fa capo all'Unità Operativa Semplice (UOS) Tumori Rari ed Ereditari Ginecologici ed al Programma Intradipartimentale di II fascia Sorveglianza dei Tumori Rari ed Ereditari Gastrointestinali. Infatti, i pazienti con tumori sostenuti da mutazioni patogenetiche germinali, necessitano di una gestione assistenziale diversificata rispetto a quella dei tumori sporadici, per la peculiarità di presentazione clinica, per la possibilità di sviluppo di tumori multipli, per le più recenti indicazioni terapeutiche nonché per le implicazioni psico-sociali correlate. Per i pazienti con tumori ereditari è altresì opportuno il coinvolgimento nel

Counseling Oncogenetico dei familiari, a scopi di prevenzione oncologica. La presa in carico dei familiari sani al Counseling Oncogenetico è finalizzata sia all'esecuzione del test genetico mirato per la specifica mutazione identificata in famiglia, sia all'offerta di programmi di prevenzione oncologica adeguati. Le attività assistenziali e di ricerca inerenti ai tumori eredo-familiari sono condotte da Oncologi Medici dedicati e da uno Psico-oncologo con specifica competenza e con esperienza in tale settore. La gestione dei pazienti e dei familiari a rischio avviene utilizzando il modello di *counseling* oncogenetico a *multistep* specificamente disegnato presso la nostra Istituzione in passato, validato a livello nazionale ed internazionale⁷. Lo psico-oncologo affianca l'oncologo in diverse fasi del *counseling* oncogenetico, dall'identificazione del rischio alla comunicazione del risultato del test genetico alla gestione del rischio, ancor più laddove i soggetti siano ritenuti dal clinico a particolare rischio di *distress* emotivo o si mostrino incapaci ad elaborare autonomamente ed adeguatamente le informazioni ricevute in ambito di *counseling* (vedi PDTA a seguire). Tutto ciò rappresenta un modello di organizzazione assistenziale per tutto il territorio regionale e motivo di vanto per l'AOU Federico II. Nel 2017 sono state erogate dall'UOC di Oncologia Medica 11.154 prestazioni ambulatoriali per visite oncologiche ed 819 di psico-oncologia. Nell'ambito degli 11.154 controlli ambulatoriali effettuati, a tutti i pazienti è stato offerto, laddove indicato, un *counseling* oncogenetico dedicato, con eventuale supporto psicologico. Inoltre, degli oltre 11.000 controlli ambulatoriali effettuati, 495 sono afferiti specificamente al gruppo di tumori eredo-familiari, che ha inoltre fornito consulenza per tutti i pazienti affetti da tumore, con mutazione nota, inseriti in percorsi di *follow-up* nell'ambito dei diversi ambulatori dei gruppi oncologici patologia-specifici di riferimento dell'UOC.

Inoltre, da molti anni l'UOC di Oncologia Medica dell'AOU Federico II dedica parte delle attività assistenziali e di ricerca clinica alla cura dei tumori rari, ed è riconosciuta come Centro di Riferimento per i tumori rari nella Regione Campania (CRTR). Nel solo anno 2017, nell'ambito dell'UOC di Oncologia Medica sono state erogate 1186 prestazioni ambulatoriali dal solo CRTR, che risulta inoltre primo centro in Campania per volumi di terapie antitumorali sistemiche erogate per tumori germinali del testicolo e tumori epiteliali del timo. Il CRTR ha anche ottenuto riconoscimento e certificazioni dal Ministero della Salute e dalla *European Reference Network* per i seguenti quattro domini: tumori epiteliali del timo, tumori rari genitourinari del maschio, tumori rari toracici e tumori endocrini e neuroendocrini.

In considerazione della crescente complessità e sofisticatezza della diagnostica citopatologica, il DAI di Onco-Ematologia, Diagnostica per Immagini e Morfologica e Medicina Legale, ha anche

⁷ Contegiacomo A, et al. on behalf of the Italian Network on Hereditary Breast Cancer. An oncologist-based model of cancer genetic counseling for hereditary breast and ovarian cancer. *Annals of Oncology* 15: 726–732, 2004

all'attivo un Programma Interdipartimentale (PI) di tipo A di Citologia e Patologia Molecolare (Dir. Prof. Giancarlo Troncone), dedicato all'effettuazione di test di patologia molecolare predittivi di risposta a trattamenti personalizzati per diverse patologie neoplastiche (vedi paragrafo successivo).

Per quanto riguarda la diagnostica molecolare delle principali sindromi eredo-familiari, l'AOU Federico II dispone di servizi di biologia molecolare dedicati offerti dall'UOC di Biologia Molecolare Clinica (Resp.: Prof.ssa Paola Izzo), incardinata nel DAI di Medicina di Laboratorio (Dir. Prof.ssa Paola Izzo), per rilevare le mutazioni responsabili delle più frequenti sindromi tumorali ereditarie del tratto gastrointestinale (MSH2/6, MLH1, PMS2, CDH1, AFP e PTEN) e si avvale della collaborazione del CEINGE (Presidente Prof. P. Forestieri) per le analisi dei geni responsabili dei tumori ereditari di mammella ed ovaio (BRCA 1 e 2), (Area laboratorio Prof. G. Castaldo; Prof. L. Pastore e Dott.ssa V. D'Argenio).

4. Piano delle attività della Piattaforma Oncogenomica

4.1 Diagnostica somatica

L'introduzione delle terapie oncologiche personalizzate e la relativa necessità di valutare i corrispondenti bio-marcatore su campioni tissutali istologici e citologici ha portato, già a partire dal 2009, ad un ampliamento delle attività dell'Anatomia Patologica della Federico II. È stato costituito un laboratorio dedicato al IV piano dell'Edificio 20, per l'esecuzione di diversi test (*companion diagnostics*) basati su di ampio spettro di metodologie morfologiche e molecolari.

Il laboratorio si distribuisce su 150mq che prevedono quattro differenti aree di lavoro per la gestione completa di un intero processo lavorativo. L'Area 1 è dedicata all'amministrazione morfologica dei campioni cito – istologici da analizzare ed alla microdissezione (manuale o laser assistita) della componente neoplastica. L'Area 2 (pre-PCR) è dedicata alla purificazione degli acidi nucleici ed all'allestimento delle reazioni di amplificazione sia per il sequenziamento genico. L'Area 3 (PCR) è dedicata alla gestione dei prodotti di PCR e delle librerie geniche amplificate. L'Area 4 (post-PCR) è destinata alla esecuzione ed interpretazione delle reazioni di sequenziamento.

Le tecniche diagnostiche predittive si incentrano sulla immunoistochimica (IHC) e sulla ibridizzazione in situ con sonde fluorescenti (FISH), per la rilevazione di amplificazioni o di fusioni geniche e su test molecolari analitici, che includono anche metodiche di *next generation sequencing* (NGS). Quest'ultima tecnica consente sia la rilevazione, con test basati sul DNA, di alterazioni di sequenza (mutazioni puntiformi; delezioni e/o inserzioni) che di alterazioni del trascrittoma,

evidenziabili sia con test basati sull' mRNA. Più recentemente la validazione di metodiche di N-Counter, ovvero sia di ibridizzazione molecolare digitale (NanoString), rappresenta nel laboratorio di Anatomia Patologica della Federico II una alternativa, per campioni poco cellulari.

L'ampio spettro di tecniche molecolari utilizzate nella nostra routine, si fonda imprescindibilmente su di una rigorosa fase pre-analitica, svolta da patologi dedicati con esperienza nella idonea preservazione e processazione del materiale tessutale e nella valutazione della percentuale di cellule neoplastiche. Questa valutazione è fondamentale, in quanto la sensibilità della tecnica molecolare adottata deve essere congrua con la presenza di un numero adeguato di cellule neoplastiche. A tale scopo, si esegue la microdissezione manuale o laser assistita (microdissettore "laser pressure catapulting (LPC)", Carl Zeiss – Palm Microsystems) della componente neoplastica.

L'attività del laboratorio riguarda la valutazione di una serie di biomarcatori predittivi di risposta al trattamento mirato delle neoplasie solide in stadio avanzato di malattia. Nei tumori del colon-retto un target fondamentale terapeutico è rappresentato dall'EGFR. Infatti una percentuale non trascurabile (oltre il 50%) di pazienti può essere trattato con farmaci che inibiscono l'EGFR; tuttavia, tali farmaci sono inefficaci in presenza di mutazioni dei geni RAS (KRAS ed NRAS). I test molecolari predittivi includono la rilevazione di mutazioni negli esoni 2, 3 e 4 di KRAS e di NRAS. In aggiunta, il test relativo alla determinazione delle mutazioni di BRAF è spesso necessario, per la stratificazione terapeutica e prognostica. Quindi in totale sono almeno 7 gli esoni che devono essere analizzati (3 per KRAS, 3 per NRAS ed 1 per BRAF). La tecnica di NGS, adottata dal laboratorio consente di effettuare simultaneamente tutte le analisi, estendendo, se richiesto, la valutazione anche ad altri geni (EGFR, CTNNB1, ERBB2 ed ALK), di possibile interesse per il reclutamento dei pazienti in studi clinici. Nella nostra Istituzione, la diagnostica molecolare del colon-retto include anche la valutazione dell'instabilità dei microsatelliti (MSI), tramite metodiche innovative di elettroforesi nano-capillare su chip. Tali tecniche evidenziano le differenze tra il tessuto tumorale e quello normale nel numero di brevi sequenze ripetute di DNA. Lo status di instabilità microsatellitare rappresenta un fattore prognostico e predittivo sia per la chemioterapia adiuvante con 5-fluorouracile, che per la immunoterapia con anticorpi anti PD-1.

Nei pazienti con adenocarcinoma polmonare in fase avanzata e concomitante mutazione del gene EGFR, la terapia con inibitori tirosin-chinasici è più efficace della chemioterapia tradizionale. Le linee guida nazionali ed internazionali, quindi, richiedono che tutti i casi di adenocarcinoma polmonare siano analizzati per le mutazioni di EGFR. Lo scopo è quello di razionalizzare l'uso di tre diversi farmaci anti-EGFR. Quattro regioni geniche, esoni 18, 19, 20 e 21, devono essere sottoposte ad analisi. A tal fine il patologo oltre alla diagnosi morfologica di adenocarcinoma polmonare deve selezionare un vetrino sufficientemente rappresentativo della neoplasia e richiedere

l'esame mutazionale di EGFR. Quest'analisi può essere svolta in maniera affidabile non solo sul campione istologico ma anche su quello ottenuto per agoaspirato o per altra procedura citologica. Il nostro laboratorio ha validato diverse tecniche di biologia molecolare tutte idonee ad analizzare campioni istologici e campioni citologici, ma diverse per rapidità (il sistema Idylla richiede complessivamente solo 3 ore), sensibilità (la tecnica di digital PCR consente una sensibilità <1% di allele mutato) e scalabilità (la tecnica di NGS permette di analizzare i campioni di 16 pazienti simultaneamente). Nei pazienti per i quali il tessuto neoplastico è scarso o non disponibile per l'esame molecolare, la cosiddetta biopsia liquida rappresenta uno strumento utile per evidenziare con assoluta specificità (100%) e moderata sensibilità (50-70%) su plasma le mutazioni attivanti di EGFR, in accordo alle indicazioni EMA ed AIFA. Inoltre, la biopsia liquida rappresenta la metodica iniziale nella valutazione della mutazione di resistenza EGFR T790M in pazienti in progressione dopo terapie con inibitori di prima o seconda generazione, candidati al trattamento con osimertinib. Il laboratorio di Anatomia Patologica della Federico II ha validato in collaborazione con l'istituto Pangaea di Barcellona (coinvolto nei principali studi clinici internazionali per la registrazione dei farmaci a bersaglio molecolare) diretto dal dr. Rafel Rosell, la metodica NGS per la ricerca delle mutazioni di EGFR su ctDNA⁽⁸⁾. Per ottimizzare la logistica e per standardizzare la fase pre-analitica, minimizzando la quota di DNA genomico rilasciato dai leucociti, il sangue del paziente viene prelevato tramite personale infermieristico direttamente nell'ambulatorio localizzato al piano terra dell'edificio 20, permettendo l'immediata plasmatura ed estrazione del DNA.

La determinazione dello stato mutazionale di BRAF è indicata per la scelta della migliore strategia terapeutica nei pazienti con melanoma inoperabile o metastatico (stadio IIIc o IV) che possono beneficiare, in presenza di mutazione V600E/K, del trattamento con inibitori di BRAF. Le mutazioni attivanti più frequenti di BRAF sono a carico dell'esone 15. La mutazione V600E, che consiste nella sostituzione della valina con acido glutammico nel codone 600, rappresenta circa il 90 % (88-92%) delle mutazioni di BRAF nel melanoma, la V600K ha una frequenza 6-8% circa mentre altre mutazioni, quali la V600R e la V600D, sono meno frequenti. Ulteriori informazioni possono essere ottenute dalla ricerca delle mutazioni di NRAS e di c-KIT. Vista la molteplicità dei biomarcatori, il nostro laboratorio svolge la diagnostica molecolare del melanoma con metodiche NGS. Analoga metodica viene impiegata per la diagnostica molecolare rivolta alla valutazione di cKIT e di PDGFRA nei tumori gastrointestinali stromali (GIST).

Sebbene le tecniche molecolari, ed in particolare, il sequenziamento genico di nuova generazione rappresentino delle tecnologie innovative, tradizionali metodiche morfologiche quali la IHC e la FISH rimangono di grande utilità clinica, in particolare per lo studio delle amplificazioni (HER2 nel carcinoma della mammella ed in

⁸ Malapelle U et al., Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients. Br J Cancer. 2017 Mar 14;116(6):802-810

quello gastrico) e delle fusioni geniche. In particolare, la valutazione delle fusioni geniche come quelle di ALK e di ROS1 nel carcinoma del polmone, richiedono un approccio combinato, integrando la IHC come metodica di screening e riservando la FISH a casi dubbi, fermo restando la possibilità di arricchire la valutazione diagnostica con metodiche molecolari avanzate di NGS e di nCounter in pazienti in cui vi è un'elevata probabilità di riscontrare tali alterazioni (età giovane, non fumatori, istologia a cellule ad anello con castone).

Elementi critici nella organizzazione della attività diagnostica predittiva molecolare riguardano sia i tempi effettivi di esecuzione delle metodiche molecolari, che i costi da sostenere per l'erogazione di tale servizio. Il nostro laboratorio svolge l'esecuzione di ognuno dei test molecolari entro 10 giorni lavorativi dall'arrivo del campione nel laboratorio. Tuttavia, il recupero dei vetrini e delle inclusioni rappresenta un momento critico e sono necessarie misure specifiche per assicurare che i tempi compresi tra la richiesta dell'oncologo e l'invio del materiale al laboratorio non superi i tre giorni. Sebbene l'importanza della diagnostica molecolare predittiva dei tumori solidi sia evidente, in Italia in generale, ed in Campania in particolare, vi è una criticità nelle modalità di rimborso dei test molecolari. Ciò riflette l'assenza di modelli di organizzazione e di una rete di laboratori regionali destinati a questa tipologia di diagnostica, così come presenti in altri Paesi, quali Francia e Germania. Sebbene non vi siano codici specifici destinati alle impegnative dei test molecolari, alcuni codici delle prestazioni ambulatoriali R possono essere utilizzati per comporre le prestazioni erogate. Ad esempio lo studio delle mutazioni su DNA estratto da tessuto degli esoni 18-21 del gene EGFR possono essere composte utilizzando i seguenti codici:

- 91.36.5 ESTRAZIONE DI DNA O DI RNA (nucleare o mitocondriale) Da sangue periferico, tessuti, colture cellulari, villi coriali;
- 91.30.3 ANALISI DI SEGMENTI DI DNA MEDIANTE SEQUENZIAMENTO (Blocchi di circa 400 bp).

Una impegnativa per ciascun esone, per un totale di 4 impegnative.

Anche in considerazione dell'implementazione della rete oncologica regionale va valutata la reale possibilità di coprire le spese relative all'erogazione dei test molecolari con la modalità delle prestazioni ambulatoriali R.

Implementazioni future

Accanto a test molecolari implementati da anni nel nostro laboratorio, prevediamo di utilizzare al più presto nella pratica clinica il test BRCA che abbiamo in precedenza validato pre-clinicamente nell'ambito di un progetto di ricerca. Infatti, le mutazioni dei geni BRCA, costituzionali o somatiche, rappresentano un biomarcatore predittivo di sensibilità al trattamento con PARP-inibitori, quali olaparib, nelle pazienti affette da carcinoma dell'ovaio in fase avanzata. In tali pazienti la prevalenza di varianti patogenetiche costituzionali BRCA è in generale >10%, toccando una frequenza considerevole nelle pazienti con carcinoma ovarico sieroso, nelle pazienti con carcinoma sieroso di alto grado, e nelle pazienti platino-sensibili.

Nel nostro laboratorio abbiamo validato un test NGS per eseguire l'analisi BRCA su tessuto tumorale a partire da un input minimo iniziale di 10-20 ng di DNA in grado di evidenziare sia le

varianti acquisite per mutazione somatica sia quelle costituzionali. In particolare le mutazioni somatiche possono rappresentare fino ad 1/3 di tutte le varianti dei geni BRCA1 e 2 giustificando l'implementazione del test in un servizio di anatomia patologica e la esecuzione di tale indagine su tessuto al momento della diagnosi istopatologica. A tal fine la nostra istituzione ha fatto parte di un consorzio internazionale teso allo sviluppo del pannello di NGS (Oncomine® BRCA Assay, Thermofisher). Tale pannello consente di eseguire l'analisi anche su piccole biopsie grazie alla tecnologia ad ampliconi. Questa tecnologia NGS si basa sulla metodica dei semiconduttori (sec. Ion Torrent) con un'ottima copertura della totalità degli ampliconi e con una sensibilità del 97,8% ed un valore predittivo positivo del 94,3% e con un limite di sensibilità pari al 5% di alleli mutati.

Tra le attività future un aspetto importante è dato dalla possibilità di applicare biomarcatori per la predizione della risposta al trattamento con immunoterapici. In particolare il nostro laboratorio sta già utilizzando come indicatore predittivo della risposta a pembrolizumab nel carcinoma del polmone il test immunocitochimico basato sul rilevamento dell'espressione di PD-L1. Il clone utilizzato è il 22C3 della Dako, che negli studi clinici Keynote è stato utilizzato esclusivamente sulla piattaforma Dako. A tal proposito, un nostro studio di validazione, svolto in collaborazione con il prof. Doglioni del San Raffaele di Milano, dimostra la possibilità di utilizzare tale anticorpo non soltanto sull'immunocoloratore Dako ma anche su quello Ventana, facilitando così l'utilizzo di questo anticorpo. Tale metodica immunocitochimica può essere svolta tanto su sezioni istologiche quanto su citoincluso e la valutazione di un'immunocolorazione superiore od inferiore al 50% detta l'utilizzo del farmaco in prima od in seconda linea non soltanto negli adenocarcinomi ma anche nei carcinomi squamosi, fino ad oggi eleggibili al solo trattamento chemioterapico. Prospettive future prevedono l'utilizzo del test immunocitochimico PD-L1 come predittore di trattamento di immunoterapia combinata nel melanoma, nel carcinoma gastrico e nel carcinoma della regione testa-collo. Il nostro laboratorio si prefigge inoltre di applicare la metodica NGS, e l'expertise maturato in questo campo dalla routine diagnostica, per valutare il carico mutazionale delle neoplasie in fase avanzata di malattia. In particolare, tale indagine rappresenta una possibile prospettiva per l'identificazione di tumori altamente immunogenici, in cui l'inibizione dell'asse PD-1/PD-L1 ha un'elevata possibilità di successo terapeutico.

4.2 Diagnostica germline

Nei laboratori dell'UOC di Biologia Molecolare Clinica del D.A.I. di Medicina di Laboratorio (Responsabile: Prof. Paola Izzo) sono effettuate dal 1995 ad oggi, in regime di convenzione con la Regione Campania e con il CEINGE, le diagnosi molecolari di poliposi familiari coloretali, quali

FAP, MAP, Sindrome di PHTS e Sindrome di PJS (di malattia e/o portatore) per le quali sono analizzati, rispettivamente, i seguenti geni: APC, MYH, PTEN e STK11; inoltre, sono eseguite le diagnosi molecolari di tumori gastrointestinali non poliposici, quali Sindrome di Lynch (di malattia e/o portatore), Sindrome di Lynch-Like e Sindrome di Cancro Gastrico Diffuso (HDGC), per le quali sono analizzati, rispettivamente, i seguenti geni: i geni del MisMatch Repair del DNA (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, MLH3 e MSH3), i geni EPCAM, PALB1 e il gene CDH1. Inoltre, sempre presso il suddetto laboratorio viene effettuata l'analisi di Instabilità dei Microsatelliti (MSI) sul DNA tumorale estratto dal tessuto incluso in paraffina, come test pre-screening al fine di individuare soggetti eleggibili per il test genetico previsto per la Sindrome di Lynch.

Le metodiche utilizzate per l'analisi di mutazioni puntiformi non-note sono state implementate nel corso degli anni. Inizialmente venivano utilizzate metodiche quali PCR-SSCP, sequenziamento diretto dei frammenti analizzati e "Protein truncation test" (PTT). Successivamente è stata introdotta la metodica del DHPLC. Le metodiche previste per l'analisi di ampi riarrangiamenti nei geni responsabili per le sindromi ereditarie sopra riportate, prevedono l'utilizzo della Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA). Le metodiche previste per l'analisi MSI prevedono l'utilizzo di una PCR multiplex e successiva analisi elettroforetica, eseguita mediante l'utilizzo di elettroforesi capillare.

Attualmente l'analisi di rilevamento delle mutazioni puntiformi in tutti i geni malattia sopra elencati, viene effettuata mediante reazione di PCR, DHPLC (quando possibile) e sequenziamento diretto dei frammenti analizzati con metodo di Sanger. Tali metodiche hanno un'alta sensibilità (circa il 98-99%), ma costi elevati e tempi molto lunghi di esecuzione in quanto spesso devono essere analizzate intere regioni codificanti di molte migliaia di coppie di base. Pertanto, per poter fare una diagnosi molecolare completa è necessario un tempo che va, solitamente dai 3 ai 6 mesi.

Attualmente, la metodica che rappresenta il gold standard per l'analisi molecolare dei tumori eredo-familiari del colon-retto è l'analisi di specifici pannelli di geni che possono essere analizzati mediante tecniche high-throughput come la "Next generation sequencing" (NGS). Tale metodica è allineata alle esigenze di mercato, in quanto rappresenta la metodica di elezione utilizzata nei principali laboratori pubblici e private, anche del territorio campano, che effettuano analisi molecolare di patologie genetiche e di sindromi tumorali ereditarie del colon-retto. Essa risulta essere molto più veloce ed economica, quando confrontata alle metodiche di PCR e sequenziamento diretto dei frammenti analizzati con metodo di Sanger e permette l'analisi contemporanea di un numero considerevole di geni.

I pazienti accedono ai nostri servizi nel modo seguente:

- Pazienti esterni con richiesta del medico curante; l'utente può accedere al servizio presso l'Ambulatorio di Medicina di laboratorio del DAI Medicina di Laboratorio.
- Pazienti ricoverati o in regime di day-hospital presso i reparti dell'AOU Federico II.
- Pazienti ricoverati o in regime di day-hospital presso altre strutture sanitarie pubbliche o private diverse dall'AOU.

Già dal 2005 è stata istituita inoltre presso il CEINGE una piattaforma tecnologica di NGS che, grazie alla disponibilità di una vasta gamma di sequenziatori, è stata impiegata anche per lo studio delle basi molecolari dei tumori ereditari della mammella e dell'ovaio.

Il carcinoma della mammella rappresenta il tumore più frequente nel sesso femminile ed è una delle principali cause di mortalità per cancro nelle donne. Circa il 10% di tutti i tumori al seno sono di tipo eredo-familiare e possono essere associati a mutazioni germinali predisponenti che, generalmente, coinvolgono i geni ad alta penetranza BRCA1 e BRCA2. I geni BRCA1 e BRCA2 codificano ciascuno per una proteina riparatrice del DNA coinvolta nella prevenzione cellulare della carcinogenesi. In presenza di mutazioni a carico dei geni BRCA (frequentemente associate alla sindrome Hereditary Breast/Ovarian Cancer – HBOC) si osserva un aumentato rischio non solo di sviluppare carcinoma della mammella ad insorgenza precoce, ma anche un aumento del rischio di tumore della mammella controlaterale, recidive, e sviluppo di altre neoplasie, tra cui in particolare il carcinoma dell'ovaio. Tali mutazioni conferiscono, inoltre, un aumento del rischio di sviluppare tumore mammario anche negli individui di sesso maschile (in cui tale patologia è generalmente molto rara). Più in dettaglio, mutazioni a carico del gene BRCA1 incrementano il rischio di sviluppare tumore della mammella del 65-85% e quello ovarico del 39-46%; mentre mutazioni nel gene BRCA2 aumentano il rischio del 45-85% e del 10-27% rispettivamente. Pertanto, l'identificazione accurata e precoce dei portatori di mutazioni è fondamentale per la pianificazione del percorso di prevenzione, diagnosi e terapia più adatto nell'ottica della medicina predittiva e personalizzata. In presenza di un paziente affetto da tumore della mammella e/o dell'ovaio, o in presenza di soggetti non affetti ma appartenenti a famiglie caratterizzate da un elevato numero di casi, è fondamentale verificare la presenza di indicazioni al test genetico al fine di verificare o escludere la presenza di una forma ereditaria in base alle più attuali linee guida.

Presso il laboratorio di NGS del CEINGE si effettua l'analisi molecolare dei geni BRCA1 e BRCA2 per l'identificazione di mutazioni predisponenti associate a HBOC ed altre sindromi oncologiche eredo-familiari. I pazienti possono accedere all'indagine molecolare in regime ambulatoriale (previa presentazione delle impegnative debitamente compilate) o in regime di day hospital (ed in questo caso la richiesta parte dal reparto clinico di riferimento).

L'indagine viene eseguita partendo da un campione di DNA genomico (gDNA) ottenuto da un campione di sangue in EDTA prelevato da ciascun paziente (previa compilazione della scheda/paziente e raccolta del consenso informato all'esecuzione del test diagnostico). La procedura analitica prevede la preparazione di librerie identificate in maniera univoca tramite l'utilizzo di specifiche sequenze barcode associate univocamente a ciascun paziente. Le librerie, unite in pool in rapporti equimolari, vengono sequenziate utilizzando la piattaforma di sequenziamento NGS MiSeq in dotazione presso il nostro laboratorio. Al termine della run di sequenziamento, i dati ottenuti (FASTQ) vengono analizzati utilizzando uno specifico software per l'analisi bioinformatica. Eventuali mutazioni identificate tramite NGS vengono confermate mediante sequenziamento Sanger, ove possibile¹⁰ (D'Argenio V et al. Clin Chim Acta. 2015;446:221-5). Inoltre, è importante sottolineare che l'analisi di sequenziamento permetterà di individuare variazioni della sequenza del DNA come mutazioni puntiformi e piccole inserzioni/delezioni che comprendono circa il 90% delle varianti patogenetiche a carico dei geni BRCA1/2. Il restante 10% è costituito da ampi riarrangiamenti genici (es. delezioni di uno o più esoni o dell'intero gene) che saranno identificati mediante Multiplex Ligation Probe dependent Amplification (MLPA). L'analisi richiede circa 3 settimane lavorative.

I risultati del test vengono comunicati ai pazienti nell'ambito di una consulenza post-test multidisciplinare, in collaborazione con gli specialisti Oncologici dedicati dell'AOU Federico II, in modo da discutere il significato e le potenziali implicazioni del test (sia in caso di positività che di negatività) per il paziente e per i suoi familiari. In presenza di un test positivo nel probando (presenza di una mutazione nota come predisponente allo sviluppo di tumori ereditari della mammella e dell'ovaio), i familiari del paziente saranno invitati ad effettuare una consulenza oncogenetica ed a sottoporsi al test molecolare per verificare la presenza della mutazione identificata nel familiare affetto.

Implementazioni future

L'analisi di sequenza dei geni BRCA1 e BRCA2 può risultare nell'identificazione di varianti dal significato clinico incerto (VUS) o di nuove varianti non riportate nei database di riferimento. In questi casi, l'esito del test molecolare è incerto e rende complessa la gestione del paziente e dei familiari in fase di consulenza, nonché nella pianificazione del successivo programma di prevenzione oncologica. Il nostro laboratorio si propone, ove possibile, di testare il significato

funzionale di tali varianti in modo da definirne il ruolo nella tumorigenesi, come già effettuato in alcune famiglie^(9,10).

Inoltre, sebbene mutazioni a carico dei geni BRCA1 e BRCA2 siano associate ad elevata penetranza per i tumori ereditari della mammella e dell'ovaio e siano in grado di conferire un elevato rischio di sviluppare patologie oncologiche nei carrier di mutazioni, solo una percentuale minoritaria (circa il 25%) delle forme eredo-familiari (con positività dei criteri di accesso al test) risultano positivi al test molecolare. Infatti, altri geni di predisposizione con bassa e media penetranza sono stati identificati ed associati all'insorgenza di tali neoplasie.

Pertanto, presso il nostro laboratorio è stata validata l'analisi di ampi pannelli di geni con elevata, media e bassa penetranza per lo sviluppo di tumori eredo-familiari, che includono (ma non si limitano a) TP53, PTEN, CDH1, NF1, ATM, CHEK2, PALB2, BRIP1, RAD51C, BARD1, SLX4, per analisi di secondo livello in pazienti negativi per la presenza di mutazioni nei geni BRCA1 e BRCA2 appartenenti a famiglie in cui è presente un elevato numero di tumori anche di differente tipologia. In particolare, abbiamo disegnato diversi pannelli per la valutazione del rischio di tumori eredo-familiari. Considerata la frequente co-presenza nell'ambito delle famiglie affette, nonché la condivisione di alcuni geni di predisposizione che sono stati associati a differenti neoplasie (mammella, ovaio, colon, prostata), abbiamo disegnato, tra gli altri, un pannello di 45 geni che permette di valutare la presenza di mutazioni germinali associate alle suddette neoplasie. In aggiunta, abbiamo disegnato un pannello per l'identificazione di mutazioni germinali associate ad un aumentato rischio di tumori neuroendocrini e melanoma (43 geni), un pannello per le mutazioni germinali associate allo sviluppo di leucemie e linfomi (83 geni), ed un pannello esteso per la valutazione di predisposizione ai tumori solidi (205 geni). L'analisi molecolare dei pannelli di geni prevede l'arricchimento del gDNA con specifiche sonde in grado di catturare le regioni genomiche target da sequenziare con le piattaforme NGS disponibili presso il nostro laboratorio.

Inoltre, in aggiunta all'identificazione di mutazioni germinali associate allo sviluppo di tumori, sfruttando l'*expertise* ed il *know-how* maturati in questi anni nonché le strumentazioni di NGS disponibili presso il CEINGE, il nostro laboratorio si propone di implementare test diagnostici basati sull'identificazione di biomarcatori circolanti (*liquid biopsy*) che possano essere utilizzati con finalità diagnostiche ma anche per il monitoraggio dei pazienti e la loro stratificazione in classi prognostiche.

⁹ Esposito MV et al. Int J Mol Sci. 2016;17(12)

¹⁰ Nunziato M et al. Int J Mol Sci. 2017;18(11)

5. Piano delle attività dell'UOC di Oncologia Medica

Nel caso di identificazione di una sindrome tumorale ereditaria i pazienti ed i familiari sani ad alto rischio oncologico, geneticamente determinato, verranno presi in carico dai diversi specialisti dell'AOU Federico II, oltre che per un corretto percorso diagnostico-terapeutico delle pazienti anche per mettere in atto adeguate strategie di prevenzione oncologica secondo specifiche linee guida nazionali ed internazionali, includenti la sorveglianza clinico-strumentale intensiva, la chirurgia profilattica e la farmacoprevenzione. Prerequisito indispensabile è la corretta individuazione dei pazienti/soggetti sani cui tale percorso assistenziale sia davvero indicato.

I pazienti affetti da tumore o soggetti sani con familiarità suggestiva saranno scrinati secondo i seguenti criteri (¹¹) dagli Oncologi dedicati dell'AOU Federico II.

Criteri per indirizzare una persona affetta da tumore al Counseling Oncogenetico:

- Paziente affetta da tumore dell'ovaio * (invasivo, non-mucinoso)
- Paziente maschio affetto da tumore della mammella
- Paziente donna affetta da tumore della mammella e almeno uno fra i seguenti:
 - Presenza già nota in famiglia di mutazione responsabile di sindromi tumorali eredo-familiari
 - Diagnosi di tumore mammario di qualunque sottotipo molecolare in paziente di età < 50 anni
 - Tumore della mammella triplo negativo diagnosticato in età ≤ 60 anni
 - Due tumori mammari primitivi nello stesso individuo (sia bilaterali, sia ipsilaterali, sincroni o metacroni)
 - Diagnosi di tumore della mammella a qualunque età e almeno uno fra i seguenti criteri:
 - Almeno un parente di I-III grado con tumore ovarico * insorto a qualunque età
 - Almeno un parente di I-III grado con tumore della mammella insorto in età < 50 anni
 - Almeno 2 parenti di I-III grado con tumore della mammella e/o tumore del pancreas e/o tumore della prostata (metastatico o con Gleason score ≥ 7) insorto a qualunque età
 - Appartenenza ad una popolazione a rischio aumentato
- Paziente con tumore della prostata metastatico

¹¹ Linee Guida NCCN 2017 mammella ovaio ereditari. www.nccn.org

- Paziente di discendenza ebraica ashkenazita con tumore della mammella, ovaio o pancreas a diagnosticato a qualunque età
- Un soggetto con storia personale e/o familiare di almeno tre dei seguenti (soprattutto se insorti in età ≤ 50 anni e/o tumori multipli in uno stesso individuo):
 - Tumore della mammella, del pancreas, della prostata (metastatico o con Gleason score ≥ 7), melanoma, sarcoma, carcinoma corticosurrenalico, tumori cerebrali, leucemia, carcinoma gastrico diffuso, carcinoma del colon-retto, dell'endometrio, della tiroide, del rene, manifestazioni dermatologiche (macule iperpigmentate della mucosa orale o labiale, pigmentazione maculare del glande, trichilemmoma con diagnosi istologica, multiple cheratosi palmoplantari, papillomatosi orale multifocale o estesa, multiple papule cutanee facciali, spesso verrucose) e/o macrocefalia o polipi amartomatosi del tratto gastrointestinale

Criteri per indirizzare un soggetto non affetto da tumore al Counseling Oncogenetico:

- Un parente di I-II grado con tumore della mammella insorto in età ≤ 45 anni
- Un parente di I-III grado con almeno uno dei seguenti:
 - Parente affetto da tumore dell'ovaio*
 - Parente affetto da tumore della mammella maschile
 - Almeno due tumori mammari primitivi in un singolo individuo
 - Almeno due soggetti con dallo stesso ramo della famiglia con tumore della mammella, di cui almeno uno insorto in età ≤ 50 anni
 - Parente con mutazione genetica nota responsabile di sindromi tumorali eredo-familiari
- Storia familiare di almeno tre dei seguenti (soprattutto se insorti in età ≤ 50 anni e/o tumori multipli in uno stesso individuo):
 - Tumore della mammella, del pancreas, della prostata (metastatico o con Gleason score ≥ 7), melanoma, sarcoma, carcinoma corticosurrenalico, tumori cerebrali, leucemia, carcinoma gastrico diffuso, carcinoma del colon-retto, dell'endometrio, della tiroide, del rene, manifestazioni dermatologiche (macule iperpigmentate della mucosa orale o labiale, pigmentazione maculare del glande, trichilemmoma con diagnosi istologica, multiple cheratosi palmoplantari, papillomatosi orale multifocale o estesa, multiple papule cutanee facciali, spesso verrucose) e/o macrocefalia o polipi amartomatosi del tratto gastrointestinale

Ad ogni modo saranno presi in carico anche soggetti per cui sia stata effettuata una valutazione meno accurata o per cui continui a sussistere un fondato rischio di sindrome tumorale ereditaria familiare, qualora ritenuto opportuno.

Note esplicative

* Tumore ovarico invasivo e di istotipo non-mucinoso.

Parenti di I grado: genitori, fratelli/sorelle, figli.

Parenti di II grado: nonni, zii, nipoti (figli di fratelli/sorelle o dei propri figli), fratellastri, sorellastre

Parenti di III grado: bisnonni, prozii, pronipoti (figli di nipoti originati dai propri figli), cugini di primo grado.

5.1 Strutturazione *multistep* del Counseling Oncogenetico

Il Counseling Oncogenetico prevede un percorso articolato in diversi step, sulla scorta di quanto già proposto e validato scientificamente da questa Istituzione (⁸), di cui 3 step pre-test genetico ed un quarto step post-test.

5.1.1 Fase pre-test

Step 1: Qualora non eseguito da altri medici in precedenza, sarà effettuata una valutazione preliminare dell'opportunità di eseguire il Counseling Oncogenetico, basata sulle linee guida di settore più aggiornate. Valutata l'opportunità di proseguire il percorso di Counseling, la prima visita sarà dedicata alla somministrazione dell'informativa relativa alle attività che saranno svolte in ambito di Counseling ed all'acquisizione del consenso per poter procedere con le attività ad esso connesse. Una volta acquisito il consenso dovrà essere spiegato al paziente quali informazioni sarà necessario fornire per poter effettuare una corretta stima del rischio e costruire un adeguato albero genealogico, così come andranno spiegati al paziente gli obiettivi di una valutazione del rischio familiare, benefici, rischi e limiti del test genetico.

Step 2: Assessment del rischio mediante accurata anamnesi familiare che riguardi parenti di I-III grado ed assessment del rischio personale che rilevi:

- Tipi di tumori
- Eventuali bilateralità
- Presenza di più tumori nello stesso individuo

- Età alla diagnosi
- Eventuale chemioprevenzione
- Eventuale chirurgia profilattica
- Eventuali test genetici effettuati
- Esame istologico di eventuali lesioni benigne
- Storia riproduttiva personale
- Visita con esame obiettivo

Sarà quindi costruito l'albero genealogico (*pedigree*) ed effettuata, in assenza del paziente, una diagnosi differenziale che consenta al clinico di orientarsi sulla sindrome tumorale eredo-familiare da indagare, una valutazione del rischio di mutazione e di sviluppare patologie tumorali.

Step 3 comunicazione del sospetto diagnostico, dei rischi connessi e prescrizione del test genetico, laddove indicato, con preparazione del paziente ai possibili risultati e loro implicazioni.

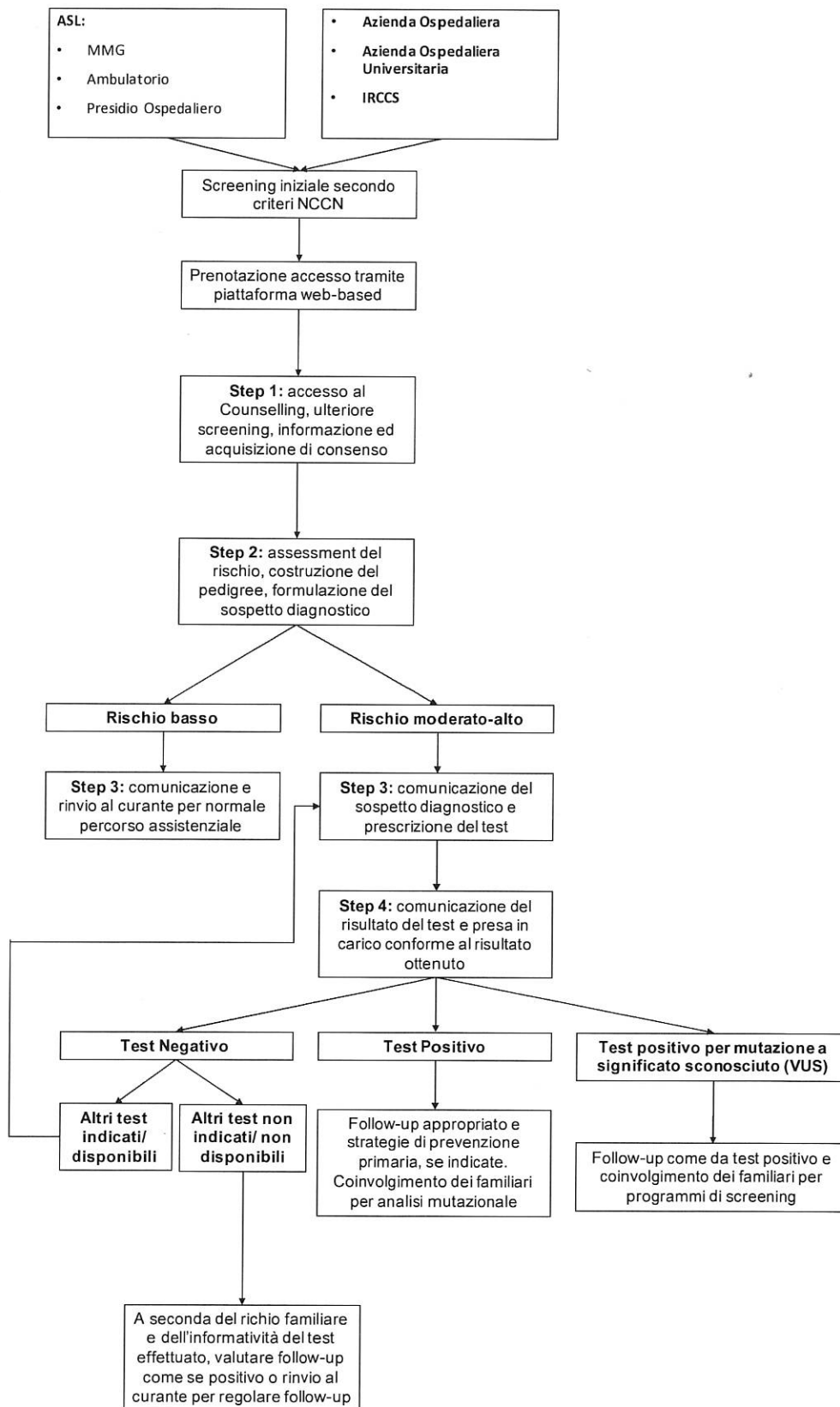
5.1.2 Fase post-test

Step 4: comunicazione del risultato del test ed avvio di eventuali programmi di prevenzione personalizzati che saranno effettuati presso l'UOC di Oncologia Medica mediante un servizio ambulatoriale dedicato. Individuazione dei parenti a rischio cui proporre eventuale Counseling.

5.2 Ruolo dello Psicologo con expertise in Psico-oncologia e tumori eredo-familiari

Durante tutte le fasi del percorso potrà essere richiesta dagli Oncologi Medici dell'UOC di Oncologia Medica dedicati alle attività di Counseling, la co-presenza dello Psico-oncologo nei diversi step del percorso, oppure il paziente potrà essere indirizzato allo Psico-oncologo dedicato per uno o più colloqui, previa acquisizione del consenso del paziente al momento dello step 1. Lo Psico-oncologo, a sua volta, potrà stabilire il percorso psicologico di supporto che riterrà più opportuno, parallelamente agli step previsti nell'ambito del Counseling Oncogenetico.

Fig.1 Flow-chart del PDTA per tumori eredo-familiari



6. Le Biobanche e la biopsia liquida

Una parte rilevante della ricerca moderna in Oncologia è costituita da nuovi approcci sperimentali che prevedono l'applicazione diretta dei risultati della ricerca preclinica (ricerca *in vitro* ed *in vivo*) alla progettazione di studi clinici volti a testare nuovi approcci diagnostici o terapeutici. Inoltre, tali approcci sperimentali hanno l'obiettivo di identificare nuovi marcatori molecolari in grado di selezionare al meglio la terapia per ogni paziente, nell'ottica di una sempre maggiore personalizzazione delle cure oncologiche. In particolare, le moderne tecniche di genomica, trascrittomica e proteomica permettono di testare ipotesi scientifiche che scaturiscono da osservazioni precliniche e cliniche e di validare su materiale patologico e/o su campioni ematici di pazienti l'utilizzo di biomarcatori capaci di identificare i soggetti in grado di giovare maggiormente di specifici trattamenti anti-tumorali. Ciò avviene generalmente nell'ambito di *trials* clinici che prevedano il prelievo di vari tipi di campioni biologici in diverse fasi dello studio. In alcuni casi (es. tumore del polmone non a piccole cellule, come in precedenza riportato) l'analisi di biomarcatori predittivi di risposta a trattamenti specifici su semplice prelievo ematico è divenuta già pratica clinica, ma le applicazioni routinarie di questa tipologia di approccio, noto come "biopsia liquida" restano ancora limitate. Assume dunque notevole rilevanza assistenziale, oltre che scientifica, offrire ai pazienti studi clinici in grado di offrire la possibilità di ricercare biomarcatori predittivi di risposta a trattamenti antitumorali per avere accesso da subito a terapie innovative personalizzate. Per l'attuazione di questa tipologia di studi è altresì essenziale disporre di Biobanche per la conservazione di materiale biologico che utilizzino tecnologie idonee a garantire le migliori condizioni di stoccaggio del materiale biologico, nonché la massima sicurezza degli operatori, nel rispetto della normativa vigente in materia. I campioni tissutali da raccogliere e conservare nella Biobanca sono essenzialmente rappresentati da sangue periferico (sangue intero, plasma e siero) e tessuto tumorale biopsizzato/escisso (sia fresco che fissato ed incluso in paraffina) prelevati da pazienti affetti da tumore solido in età adulta.

7. Offerta per l'esterno

Il Centro di Oncogenomica e Tumori Eredo-Familiari AOU Federico II si propone di mettere a disposizione il proprio patrimonio professionale e tecnologico non solo per i pazienti e loro familiari presi in carico nel Centro Oncologico di Riferimento dell'AOU Federico II e che afferiscono da UOC interne all'azienda ospedaliera, bensì vuole proporsi quale vero e proprio *Hub* regionale per garantire l'accesso a tutti i pazienti affetti da tumore a piattaforme oncogenomiche all'avanguardia per l'impostazione di terapie personalizzate ed innovative e per dare una corretta risposta ai bisogni assistenziali della popolazione tutta, in merito ai processi di diagnosi, cura e follow-up dei tumori eredo-familiari. Ciò avverrà stabilendo rapporti di collaborazione inter-istituzionali mediante apposite convenzioni. Inoltre, è stata approntata una piattaforma *web-based*, disponibile all'indirizzo https://www.oncotech.org/gim/home/?old_project=1, che possa fornire ai cittadini informazioni di utilità pratica in merito a terapie personalizzate e tumori eredo-familiari e che consenta di mettere agevolmente in contatto i professionisti di altre Istituzioni ed i cittadini con i professionisti dedicati al Counseling Oncogenetico dell'UOC di Oncologia Medica.

8. Impegno formativo dell'Università Federico II

L'Università degli Studi di Napoli Federico II, mettendo a frutto le competenze ormai da lungo tempo acquisite dal proprio personale docente in ambito di Oncogenomica, personalizzazione delle cure e gestione dei tumori eredo-familiari, si propone di fornire nozioni specialistiche nel campo della genomica e della biologia molecolare applicate allo studio dei processi di crescita e progressione tumorale, nonché all'acquisizione di resistenza alle terapie antitumorali. L'obiettivo è quello di formare Oncologi Medici specialisti nel settore della ricerca, diagnostica e terapia molecolare dei tumori al fine di completarne la preparazione scientifica e tecnologica per porli come tramite fra il mondo della ricerca di base e la clinica, nonché come attuatori delle nuove strategie terapeutiche basate sulla medicina di precisione. A tal scopo a partire dall'anno accademico 2018/2019 sarà attivato un Corso di Perfezionamento in Oncogenomica presso il Dipartimento Universitario di Medicina Clinica e Chirurgia rivolto ai laureati in Medicina e Chirurgia, preferenzialmente, sebbene non esclusivamente, specializzati in Oncologia Medica. Alla fine del Corso, i partecipanti saranno in grado di affrontare tematiche innovative legate all'applicazione di nuove metodiche di genomica e biologia molecolare per la diagnosi e la corretta gestione clinica delle sindromi tumorali ereditarie, nonché per la definizione molecolare e l'impostazione di terapie personalizzate per le patologie oncologiche.

9. Obiettivi e considerazioni finali

In conclusione, l'obiettivo del Centro di Oncogenomica e Tumori Eredo-Familiari AOU Federico II è quello di divenire *Hub* regionale per la diagnosi molecolare dei tumori tramite piattaforme oncogenomiche all'avanguardia e di rappresentare un fondamentale punto di riferimento per tutti i centri di I e II livello della Rete Oncologica Campana. In particolare, il Centro si propone di:

1. Migliorare sensibilmente la qualità dell'assistenza ai pazienti oncologici campani riducendo la migrazione sanitaria legata alla difficoltà nel reperire centri in grado di garantire analisi genomiche accurate sia su pezzi operatori sia su campioni ematici per valutazione di mutazioni somatiche o germinali;
2. Incrementare il ricorso a strategie di trattamento personalizzate, in ottemperanza a quanto previsto dalle principali linee guida nazionali ed internazionali, consentendo una riduzione di trattamenti inutili, minore tossicità e maggiore efficacia dei percorsi di cura;
3. Occuparsi della presa in carico dei pazienti e dei loro parenti affetti da tumori su base eredo-familiare, identificandone le eventuali cause genetiche ed impostando adeguati percorsi di prevenzione secondaria e fornendo indicazioni ad eventuali trattamenti farmacologici e/o chirurgici di prevenzione primaria;
4. Favorire l'accesso a studi clinici in grado di offrire terapie innovative e strategie di cura personalizzate prima che siano disponibili nella pratica clinica standard;
5. Impegnarsi sul versante dell'Alta Formazione con il proprio personale docente, istituendo nell'ambito dei Corsi di Formazione Post-Laurea dell'Università degli Studi di Napoli Federico II un Corso di Perfezionamento in Oncogenomica. Così da promuovere l'applicazione di nuove metodiche di genomica e biologia molecolare per la diagnosi e la corretta gestione clinica delle sindromi tumorali ereditarie, nonché per la definizione molecolare e l'impostazione di terapie personalizzate per le patologie oncologiche.

Tabella 3. Servizi di diagnostica oncogenomica offerti dalla AOU "Federico II"

Prestazione	Campione	Sede	Edificio	Piano	Stanza	Giorni	Orari	N. Impegnative	Codice SSN	Dicitura	Ripetuto
Biopsia liquida	Ematico	DIAGNOSTICA MOLECOLARE IN CITOPATOLOGIA	20	4	6	lun-ven	09:00-14:00	1	90365,001	estrazione DNA/RNA	1 volta
								1	91303,001	analisi di segmenti di DNA mediante sequenziamento	2 volte
								1	91293,001	analisi DNA con PCR e elettroforesi	2 volte
								1	91492,001	prelievo di sangue	1 volta
								2	91303,001	analisi di segmenti di DNA mediante sequenziamento	2 volte
BRAF	Istologico	DIAGNOSTICA MOLECOLARE IN CITOPATOLOGIA	20	4	6	lun-ven	09:00-14:00	2	91293,001	analisi DNA con PCR e elettroforesi	2 volte
								1	91365,001	estrazione DNA/RNA	1 volta
								1	91303,001	analisi di segmenti di DNA mediante sequenziamento	1 volta
								1	91293,001	analisi DNA con PCR e elettroforesi	1 volta
C-KIT e PGGFRA	Istologico	DIAGNOSTICA MOLECOLARE IN CITOPATOLOGIA	20	4	6	lun-ven	09:00-14:00	1	91365,001	estrazione DNA/RNA	1 volta
								1	91303,001	analisi di segmenti di DNA mediante sequenziamento	2 volte
								1	91293,001	analisi DNA con PCR e elettroforesi	2 volte
								2	91303,001	analisi di segmenti di DNA mediante sequenziamento	2 volte
								2	91293,001	analisi DNA con PCR e elettroforesi	2 volte
								2	91293,001	analisi DNA con PCR e elettroforesi	2 volte

EGFR	Istologico	DIAGNOSTICA MOLECOLARE IN CITOPATOLOGIA	20	4	6	lun-ven	09:00-14:00	1	91365,001	estrazione DNA/RNA	1 volta
								1	91303,001	analisi di segmenti di DNA mediante sequenziamento	2 volte
								1	91293,001	analisi DNA con PCR e elettroforesi	2 volte
								2	91303,001	analisi di segmenti di DNA mediante sequenziamento	2 volte
								2	91293,001	analisi DNA con PCR e elettroforesi	2 volte
MSI	Istologico	DIAGNOSTICA MOLECOLARE IN CITOPATOLOGIA	20	4	6	lun-ven	09:00-14:00	1	91365,001	estrazione DNA/RNA	1 volta
								1	91303,001	analisi di segmenti di DNA mediante sequenziamento	2 volte
								1	91293,001	analisi DNA con PCR e elettroforesi	2 volte
								2	91303,001	analisi di segmenti di DNA mediante sequenziamento	3 volte
								2	91293,001	analisi DNA con PCR e elettroforesi	3 volte
RAS/BRAF	Istologico	DIAGNOSTICA MOLECOLARE IN CITOPATOLOGIA	20	4	6	lun-ven	09:00-14:00	1	91365,001	estrazione DNA/RNA	1 volta
								1	91303,001	analisi di segmenti di DNA mediante sequenziamento	3 volte
								1	91293,001	analisi DNA con PCR e elettroforesi	3 volte
								2	91303,001	analisi di segmenti di DNA mediante sequenziamento	4 volte
								2	91293,001	analisi DNA con PCR e elettroforesi	4 volte

RAS	Istologico	DIAGNOSTICA MOLECOLARE IN CITOPATOLOGIA	20	4	6	lun-ven	09:00-14:00	1	91365,001	estrazione DNA/RNA	1 volta
								1	91303,001	analisi di segmenti di DNA mediante sequenziamento	3 volte
								1	91293,001	analisi DNA con PCR e elettroforesi	3 volte
								2	91303,001	analisi di segmenti di DNA mediante sequenziamento	3 volte
								2	91293,001	analisi DNA con PCR e elettroforesi	3 volte
BRCA1 e BRCA2	Ematico	CEINGE	3/E			lun-ven	07:30-11:30	1	91.36.5	estrazione di DNA	1 volta
								1	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	3 volte
								2	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	8 volte
								3	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	8 volte
								1	91.36.5	estrazione di DNA	1 volta
Mutazione genetica nota	Ematico	CEINGE	3/E			lun-ven	07:30-11:30	1	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	1 volta
								1	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	1 volta
								1	91.36.5	estrazione di DNA	1 volta
								1	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	6 volte
								2	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	8 volte
BRCA1 e BRCA2 somatico	Istologico	DIAGNOSTICA MOLECOLARE IN CITOPATOLOGIA	20	4	6	lun-ven	09:00-14:00	1	91.36.5	estrazione di DNA	1 volta
								1	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	6 volte
								1	91.36.5	estrazione di DNA	1 volta
								1	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	6 volte
								2	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	8 volte

NGS ad ampio spettro (da 50 a 500 geni) somatico	Istologico o sangue	DIAGNOSTICA MOLECOLARE IN CITOPATOLOGIA	20	4	6	lun-ven	09:00-14:00	1	91.36.5	estrazione di DNA	1 volta
								2	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	8 volte
								2	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	8 volte
MSI	Istologico ed Ematico	CEINGE	3/E	Terra		lun-ven	07:30-11:30	1	9136.5	estrazione DNA/RNA	2 volte
									91.30.2	analisi di polimorfismi VNTR	4 volte
									91.29.3	analisi DNA con PCR e elettroforesi	1 volta
MLH1 e MSH2	Ematico	CEINGE	3/E	Terra		lun-ven	07:30-11:30	1	91.36.5	estrazione di DNA	1 volta
								1	91.29.3	analisi DNA con PCR e elettroforesi	5 volte
								1	91.38.1	analisi di mutazione mediante DHPLC	2 volte
								2	91.38.1	analisi di mutazione mediante DHPLC	4 volte
								2	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	4 volte
MSH6	Ematico	CEINGE	3/E	Terra		lun-ven	07:30-11:30	1	91.36.5	estrazione di DNA	1 volta
								1	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	5 volte
PMS2	Ematico	CEINGE	3/E			lun-ven	07:30-11:30	2	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	6 volte
								1	91.36.5	estrazione di DNA	1 volta
								1	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	5 volte
								2	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	6 volte

Mutazione genetica nota (geni MMR)	Ematico	CEINGE	3/E	Terra	lun-ven	07:30-11:30	1	91.36.5	estrazione di DNA	1 volta
								91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	2 volte
								91.38.1	analisi di mutazione mediante DHPLC	1 volta

Ampi riarrangiamenti (geni MMR)	Ematico	CEINGE	3/E	Terra		lun-ven	07:30-11:30	1	91.36.5	estrazione di DNA	1 volta
								1	91.29.4	analisi mutazionale del DNA con reazione polimerasica a catena e ibridazione con sonde non radio marcate	3 volte
APC	Ematico	CEINGE	3/E			lun-ven	07:30-11:30	1	91.36.5	estrazione di DNA	1 volta
									91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	7 volte
								1	91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	5 volte
								1	91.36.5	estrazione di DNA	1 volta
MUTYH	Ematico	CEINGE	3/E			lun-ven	07:30-11:30	1	91.29.4	analisi di mutazioni del DNA con reazione polimerasica a catena e ibridazione con sonde non radiomarcate	3 volta
									91.36.5	estrazione di DNA	1 volta
STK11/LKB1	Ematico	CEINGE	3/E			lun-ven	07:30-11:30	1	91.36.5	estrazione di DNA	1 volta
									91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	5 volte
PTEN	Ematico	CEINGE	3/E			lun-ven	07:30-11:30	1	91.36.5	estrazione di DNA	1 volta
									91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	5 volte
Mutazione genetica nota	Ematico	CEINGE	3/E			lun-ven	07:30-11:30	1	91.36.5	estrazione di DNA	1 volta
									91.30.3	analisi di mutazione del DNA mediante sequenziamento	2 volta
Consulenza		AOU	1/A			mar-	09:00-16:00	1	89010.053	visita di controllo	1 volta

genetica pre- e post-test													oncologica		
Visita di controllo ambulatorio tumori eredo-familiari	AOU		1/A					14:30-16:00	1		89010.053		visita di controllo oncologica	1 volta	
Consulenza genetica pre- e post-test	AOU		19/A	Terzo				09:00-12:30	1		89.01		Consulenza di genetica e/o citogenetica prenatale (consulenza oncogenetica pre- e post- test per la diagnostica molecolare dei tumori ereditari del colon-retto)	1 volta	