2013

GRUPPO DI STUDIO

TUMORI GINECOLOGICI

IL CARCINOMA DELL'OVAIO: ASPETTI ANATOMOPATOLOGICI E DI BIOLOGIA MOLECOLARE.

A cura di:

Bruno Ghiringhello (coordinatore)

Josephine Prestipino

Nicoletta Ravarino

Francesca Maletta

Laura Zavallone

Il documento è stato valutato e validato dal gruppo di studio sui

TUMORI GINECOLOGICI così composto:

Aguggia Vittorio, Aroasio Emiliano, Ballario Paola, Barbero Maggiorino, Beldì Debora, Bianciotto Andrea, Bocci Francesco, Bretti Sergio, Camanni Marco, Carapezza Mariangela Anna, Ciccone Giovannino, Danese Saverio, Enria Raffaella, Ferrero Annamaria, Franchini Loredana, Fruncillo Rosanna, Galletto Luciano, Ghiringhello Bruno, Gregori Gianluca, Gribaudo Sergio, Iskra Liliana, Katsaros Dionyssios, Longo Virginia, Marenco Davide, Marocco Francesco, Martra Francesca, Menato Guido, Montemurro Filippo, Montironi Pierluigi, Musante Francesco, Pagano Eva, Peano Elisa, Petracchini Massimo, Piovano Elisa, Prestipino Josephine, Pontiglio Enrica, Ponzone Riccardo, Puppo Andrea, Ravarino Nicoletta, Rigault Irene, Ritorto Giuliana, Rossi Annalisa, Tessa Maria, Trifoglio Oria, Scapoli Paola, Urgesi Alessandro, Varetto Teresio, Vaudano Giacomo, Vendola Nicoletta, Viora Elsa, Zavallone Laura, Zola Paolo.

Indice

Percorso diagnostico …..... pag. 4

Citologia …..... pag. 5

- Modalità di invio del campione citologico (liquidi di versamento e washing)

- Modalità invio campione istologico (biopsie, pezzi chirurgici):

Esame estemporaneo intraoperatorio …..... pag. 6

- Limiti dell'esame intraoperatorio:

Stadiazione pTNM e FIGO …..... pag. 10

Bibliografia

PERCORSO DIAGNOSTICO

La diagnosi preoperatoria delle masse ovariche/pelviche è clinico-strumentale-laboratoristica, ma senza una diagnosi istologica vi è sempre un certo grado di incertezza. L'istologia è l'unica in grado di determinare con sicurezza il tipo e grado della neoplasia, importante in quanto sottotipi diversi di carcinoma ovarico richiedono trattamenti diversi (es. il carcinoma mucinoso, a cellule chiare e sieroso di basso grado esibiscono scarsa risposta alla CT/platino). La diagnosi istologica generalmente vien fatta su pezzo operatorio ed in ultima istanza ed in mancanza di quest'ultimo sul materiale fornito da un tru-cut o da una biopsia laparoscopica (1).

Citologia:

1) La tecnica di agoaspirazione (FNA) nella diagnosi dei tumori maligni è molto controversa a causa del rischio di disseminazione di cellule neoplastiche lungo il percorso dell'ago e della rottura della capsula tumorale con conseguente disseminazione di cellule maligne nella cavità peritoneale. De Crispigny ed al. (1989) e Greenebaum ed al. (1996) consigliano di limitare l'aspirazione alle cisti di meno di 10 cm di diametro con setti spessi o aree solide agli U.S (2).

2) L'analisi del liquido ascitico nelle pazienti in stadio avanzato è in grado di fornire una diagnosi se non di certezza almeno orientativa per iniziare una eventuale chemioterapia preoperatoria (3). I limiti sono rappresentati dalla quantità di liquido prelevato con la paracentesi che dev'essere di almeno 30-40 cc e contenere un minimo di 500.000 cellule in modo da poter allestire un citoincluso ed ottenere anche delle sezioni bianche su cui eseguire dell'immunocitochimica. Quest'ultima aumenta l'accuratezza diagnostica dell'esame citologico (57-87%) (1). Nel processo di diagnosi differenziale è da tenere in conto il carcinoma sieroso ovarico, il mesotelio reattivo, il mesotelioma, altre neoplasie ovariche e le neoplasie da sedi extraovariche (es. gastroenterico) (Tab 1 e Tab 2).

Tab 1 - Immunomarkers usati nella diagnosi differenziale tra cellule di adenocarcinoma e cellule mesoteliali (4) :

Marcatori	Mesotelioma positività %	Adenocarcinoma positività %
CA 19-9	0 - 3	56 - 67
Ber Ep 4	01/09/13	83 - 100
B 72.3	0 - 3	65 - 100
MOC 31	3 - 9	83 - 98
Claudina -4	0	96 - 99

Calretinina	85 - 100	0 - 38
WT1	43 - 93	89 - 93
CK 5/6	53 - 100	22 - 35

Tab 2. Immunomarkers usati nella diagnosi differenziale tra adenocarcinoma a primitività ignota, cellule mesoteliali reattive e mesotelioma:

Organo	**EC**		**CEA**		**MOC-31**		**Ber-EP4**		**HBME-1**		**CR**		**Thromb**	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Polmone	30	2	31	1	22	10	21	7	25	7	6	26	13	19
Ovaio	**12**	**0**	**6**	**6**	**9**	**3**	**11**	**1**	**11**	**1**	**1**	**11**	**2**	**10**
Mammella	4	0	2	2	2	2	2	2	4	0	0	4	2	2
Stomaco	0	3	2	1	2	1	2	1	2	1	0	3	0	3
Colon	3	1	4	0	3	1	3	0	3	1	0	4	0	4
Pancreas	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
Col	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1

ecisti														
Tiroide	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
Endometrio	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
RM	0	35	0	35	3	32	3	29	28	7	29	6	12	23
Mesotelioma	1	17	2	13	1	17	2	4	14	4	15	3	13	5

*EC E-caderina; MR mesoteliali reattive; Tromb trombomodulina. (5)

3) L’esame citologico del fluido proveniente dalla cavità addominale, eseguito in contemporanea all’intervento chirurgico, consente di migliorare la stadiazione del carcinoma ovarico e di altre neoplasie ginecologiche (concetto introdotto per la prima volta dalla classificazione FIGO nel 1986). Il vantaggio di questa procedura sta nel dimostrare una diffusione neoplastica anche in assenza di lesioni visibili, di verificare la presenza di persistenza o recidiva di malattia durante le procedure di II look chirurgico, di scoprire carcinomi occulti durante laparotomie o laparoscopie eseguite per malattia benigna o di scoprire carcinomi metastatici da sede non ginecologica.

<u>Modalità di invio del campione citologico (liquidi di versamento e washing):</u>

Invio dell’intera quantità di liquido prelevato in contenitori a parete rigida a chiusura ermetica. Se è prevista la consegna in laboratorio in tempi brevi conservazione in frigorifero a 4° gradi centigradi; se prevista entro le 24 ore aggiungere etanolo 50 in rapporto 1/1 (per ottenere un buon incluso) (6, 7).

Modalità invio campione istologico (biopsie, pezzi chirurgici):

Il materiale operatorio deve essere inviato integro, senza tagli e dissezioni preliminari, in liquido fissativo, in adeguata quantità e contenitore idoneo, oppure a fresco con invio tempestivo; piccole biopsie inviate a fresco poste su garza imbevuta di soluzione fisiologica. 7

Notizie cliniche:

Per agevolare la diagnosi cito/istologica il materiale inviato in laboratorio di anatomia patologica dovrebbe essere corredato dalle seguenti informazioni:

1) eventuale stato di gravidanza, AUB, precedenti terapie (ormonali, RT, CHT), precedenti interventi chirurgici rilevanti, storia familiare di neoplasia mammaria/ovarica;

2) esami radiologici, dati di laboratorio (RMI) e ascite;

3) diagnosi clinica;

4) tipo di procedura effettuata;

5) dati inerenti l'intervento (ad es. rottura preoperatoria, intraoperatoria o postoperatoria)

6) tipo di materiale-sede del materiale (8).

Esame estemporaneo intraoperatorio:

Nella gestione della patologia ovarica trova applicazione, più che in qualunque altro campo della ginecopatologia, l'esame estemporaneo intraoperatorio ricordandosi peraltro che esso ha delle indicazioni ben precise:

1) essere richiesto solo se impatta effettivamente il comportamento chirurgico ed evitare sovra- e sottotrattamenti (no nelle neoplasie in stadio avanzato);

2) evitare di chiederlo per semplice curiosità o per dare in anteprima la diagnosi alla paziente;

3) conferma istologica di un tumore ovarico maligno/borderline ed esclusione di malignità per una lesione sospetta benigna.

Limiti dell'esame intraoperatorio:

1) errore di campionamento macroscopico in quanto non è possibile esaminare tutte le aree sospette nei tempi ristretti dell'esame (più comunemente tipico nei tumori mucinosi dovuto alla loro eterogeneità e dimensioni: in tal caso si consigliano 2-3 sezioni in aree non contigue);

2) qualità delle sezioni criostatiche che può limitare la valutazione del dettaglio cellulare;

3) esperienza del patologo (meglio se ginecopatologo);

4) l'incapacità di definire l'istotipo preciso nelle neoplasie solide;

5) bassa sensibilità nella diagnosi di tumore borderline e poca accuratezza nel distinguere quest'ultimo dai carcinomi (la difficoltà diagnostica è maggiore nel tipo mucinoso comparato alla controparte sierosa);
6) difficoltà nella diagnosi di carcinoma mucinoso ovarico primitivo;

7) difficoltà nella diagnosi differenziale tra carcinoma ovarico primitivo e secondario (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16).

L'esame ha un'alta sensibilità, specificità e VPP (valore predittivo positivo) per le lesioni benigne e maligne primitive dell'ovaio. Ha bassa sensibilità e valore predittivo positivo nella diagnosi di tumore borderline (rischio di sotto e sovradiagnosi, rispettivamente del 10% e del 7%) (Tab 3)

Tab 3.

	Tumore maligno	**Tumore benigno**	**Tumore borderline**
Sensibilità	79,6-93%	92,8-100%	44,4-84%
Specificità	97,1-100%	88,6-92,7%	93,8-97,9%
VPP	91,1-100%	89,6-92,2%	63-88,9%

Nonostante le difficoltà l'accuratezza totale è dell' 87,8 - 94% ed è quindi un esame altamente raccomandato (17).
I tempi di refertazione sono circa 20 minuti dal momento in cui il materiale giunge al laboratorio di anatomia patologica e l'invio di fax/diagnosi telefonica con il chirurgo (18).
Classificazione istologica delle neoplasie ovariche (WHO 1998)
Attualmente per la classificazione delle neoplasie ovariche si fa riferimento alla terminologia utilizzata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO 1998).

Tumori dell'epitelio superficiale-stroma con i loro sottotipi istologici:

- sieroso (benigno, borderline, maligno)
- endometrioide (benigno, borderline, maligno)
- a cellule chiare (benigno, borderline, maligno)
- mucinoso (benigno, borderline, maligno)
- epiteliale misto (benigno, borderline, maligno)

- transizionale (benigno, borderline, maligno)
- squamoso
- carcinoma indifferenziato
- tumore mulleriano misto maligno/carcinosarcoma

Tumori a cellule germinali:

- Disgerminoma
- Carcinoma embrionario
- Tumore del seno endodermico (yolk salk)

- Coriocarcinoma
- Terama (maturo, immaturo, monodermico)
- Tumori germinali misti

Tumori dello stroma dei cordoni sessuali

- Fibroma/fibrotecoma
- Tumore a cellula della granulosa
- Tumore a cellule di Sertoli/Leydig

Attualmente sulla base dell'aspetto istopatologico, immunoistochimico e di genetica molecolare (19) si identificano almeno 5 tipi di carcinoma ovarico (che comprendono circa il 98% delle neoplasie epiteliali maligne):

1) Carcinoma sieroso di alto grado (HGSC)
2) Carcinoma endometrioide (EC)
3) Carcinoma a cellule chiare (CCC)
4) Carcinoma mucinoso (MC)
5) Carcinoma sieroso di basso grado (LGSC)

Di recente è stata proposta da Kurman (20, 21) una suddivisione delle neoplasie epiteliali maligne in due gruppi basata su aspetti distintivi morfologici e genetici/molecolari:

Tipo I: Sieroso di basso grado, endometrioide di basso grado, mucinoso e a cellule chiare.

Tipo II: Sieroso di alto grado, endometrioide di alto grado, carcinoma indifferenziato, carcinosarcoma.

I tumori di tipo I hanno una crescita lenta, si presentano confinati all'ovaio, raramente hanno mutazioni della p53 e sono relativamente stabili geneticamente; ma ciascun tipo morfologico esibisce un distinto profilo molecolare/genetico. In più evidenziano uno stretto rapporto

mutazionale con la corrispondente neoplasia benigna, spesso attraverso uno step intermedio (borderline), supportando il continuum morfologico della progressione tumorale.

I tumori di Tipo II hanno una prognosi infausta per crescita rapida e malattia in stadio avanzato alla diagnosi, un'alta frequenza di mutazioni di p53 ed alterazioni molecolari che influenzano l'espressione di BRCA.

Immunoistochimica:

E' una tecnica ancillare di supporto alla diagnosi morfologica e prevede l'utilizzo di un pannel di marcatori dal momento che nessun anticorpo è totalmente specifico per un dato tumore.

Trova applicazione nel tipizzare un tumore ovarico primitivo e differenziare un carcinoma primitivo da uno metastatico.

Seguendo il modello Prat (19):

- HGSC (sieroso di alto grado): p53, BRCA1, WT1+, p16 +, ER (60%)
- LGSC (sieroso di basso grado): come HGSC
- EC (endometrioide) : vimentina +, CK7 (97%), CK 20 (13%), EMA+, ER+, PR+
- CCC (cellule chiare): HNF 1-beta +, ER -, WT1 –
- PMCO (carcinoma ovarico mucinoso primitivo): CK7 + (80%), CK 20 + (65% ma debole e focale), p16 + (focale), racemasi -
- SOMCI (carcinoma ovarico mucinoso secondario intestinale): CA 125 -, WT1 -, CK7 -, CK20 +, CDX2 +, ER-, PR-.

La distinzione del carcinoma sieroso di alto grado dall'endometrioide di alto grado non è sempre facile sia dal punto di vista morfologico che dell'immunoistochimica; comunque questa distinzione generalmente non è importante perché la prognosi stratificata per stadio ed il trattamento sono simili.

Nella distinzione del carcinoma mucinoso secondario versus primitivo è di ausilio l'algoritmo: bilateralità della lesione e diametro inferiore a 13 cm di diametro depongono per la secondarietà della lesione (19, 21, 22, 23, 24).

Biologia molecolare

1)Carcinoma sieroso di alto grado: mutazioni di p53 (60%) e del gene BRCA (ereditario), diffusi ed alti livelli di perdite o acquisizioni di DNA copy number sui loci di CCNE1 (cyclin E1), NOTCH3, AKT2, RSF1 e PIK3CA.

Al contrario di quanto accade in altre neoplasie (tipo colon) non è stata dimostrata la presenza di un modello di mutazioni geniche in sequenza che portano all'accumulo di alterazioni geniche determinanti la progressione della neoplasia. Anche il più piccolo carcinoma sieroso è già di alto grado ed assomiglia morfologicamente alla sua controparte avanzata e già in carcinomi sierosi molto piccoli ed in stadio I sono presenti mutazioni di p53.

2) Carcinoma sieroso di basso grado: mutazioni di BRAF (38%) e KRAS (19%), mutualmente esclusive. Le stesse mutazioni sono state riscontrate in alcuni tumori sierosi borderline (SBTs) del tipo micropapillare e tipico; quelli che acquisiscono delezioni alleliche di 1p36 e 9p21 progrediscono verso il carcinoma.

3) Adenocarcinoma endometrioide: mutazioni attivanti di CTNNB1 (gene che codifica la beta-catenina) sono presenti in circa il 40% dei casi e mutazioni inattivanti di PTEN nel 20%. La mutazione di quest'ultimo sembra essere un evento precoce: è presente anche nelle cisti endometriosiche adiacenti alla neoplasia. Un'altra mutazione scoperta più di recente è quella del gene ARID1A. I rari casi ereditari sono portatori di mutazioni dei geni di riparo del DNA mismatch (MSH2 e MLH1).

Nel tentativo di delineare meglio il processo di tumorigenesi del carcinoma ovarico, ci si è chiesto se il carcinoma endometrioide di alto grado sia il risultato della progressione di un carcinoma endometrioide di basso grado e non sia invece una variante di carcinoma sieroso di alto grado: la presenza di frequenti mutazioni di p53 e l'assenza di mutazioni del pathway PTEN depongono per la seconda ipotesi.

4) Carcinoma a cellule chiare: mutazioni di ARID1A (50%) e di PIK3CA (50%), delezioni di PTEN (20%), mutazioni di CTNNB1 e del fattore epatocitario-1 beta (HNF-1beta) (upregolato). La mutazione di ARID1A è stata identificata nel tumore e nell'adiacente endometriosi, ma non nell'endometriosi a distanza.

5) Tumori mucinosi di tipo intestinale: mutazioni di KRAS sono presenti in circa il 75% di carcinomi mucinosi primitivi. La stessa mutazione è presente nel carcinoma mucinoso e nell'adiacente cistoadenoma mucinoso e tumore borderline. Un aspetto molecolare che supporta il continuum morfologico della progressione tumorale nelle neoplasie mucinose ovariche (19, 21, 25, 26).

Stadiazione pTNM e FIGO

Stadiazione TNM e FIGO sec UICC TNM Classification of Malignant Tumours VII ed 2009.
La classificazione dei tumori ovarici è applicabile a neoplasie maligne di origine sia epiteliale che stromale includendo le forme borderline o a bassa malignità.

Salpinge classificazione applicabile solo ai carcinomi.

Check list di refertazione:

Carcinoma dell'ovaio

- tipo istologico
- grado istologico sec FIGO*
- invasione linfatica e venosa

- pTNM (TNM 2009); stadio FIGO (1988)
- sede
- superficie sierosa
- parenchima ovarico residuo
- salpinge
- impianti

***Per il carcinoma sieroso si usa un sistema di gradazione binario; per l'endometrioide si adopera la gradazione FIGO utilizzata per la controparte endometriale; il carcinoma a cellule chiare è per definizione un alto grado; il carcinoma mucinoso è generalmente di basso grado.**

Bibliografia

1) NICE Clinical guidelines. Ovarian cancer: the recognition and initial management of ovarian cancer (Dicembre 2010).
2) De Cryspigny et al. The simple ovarian cyst: aspirate or operate? British Journal of Obstetrics and Gynecology 1996: 1035-1039.
3) P.E. Schwartz e Wenxin Zheng. Neoadiuvant chemoterapy for advanced ovarian cancer: the role of cytology in pretratment diagnosis". Gynecologic Oncology 90 (2003); 644-650.
4) Chowdhuri SR, et al. "Adenocarcinoma cells in effusion cytology as a diagnostic pitfall with potential impact on clinical management: a case report with brief review of immunomarkers". Diagn Cytopathol. 2012 Nov 16. doi: 10.1002/dc.22915.

5) Su X, et al. “Cytological differential diagnosis among adenocarcinoma, epithelial mesothelioma, and reactive mesothelial cells in serous effusions by immunocytochemistry”. Diagn Cytopathol. 2011 Dec;39(12):900-8. doi: 10.1002/dc.21489. Epub 2010 Sep 10.
6) S. Daniel,T. Zanin Manuale di tecnica cito-istologica 09/97.
7) Koss L.G. Koss'diagnostic cytology and its histopathologic bases. V°ed.2006.
8) Linee guida ovaio CAP (College of American Pathologist), 2012.
9) Bige O, et al. Frozen section diagnoses of 578 ovarian tumors made by pathologists with and without expertise on gynecologic pathology. Gynecol Oncol. 2011; 123:43-6
10) Baker P, et al. A practical approach to intraoperative consultation in gynecological pathology. Int J Gynecol Pathol. 2008 Jul;27:353-65
11) Zannoni GF. The frozen section in ovarian pathology. Congresso Annauale di Anatomia Patologica SIAPEC-IAP, Firenze, 25-27 ottobre 2012 13
12) Kim JH, et al. Clinical analysis of intra-operative frozen section proven borderline tumors of the ovary. J Gynecol Oncol. 2009; 20:176-18
13) Li M, et al. Analysis of diagnosis accuracy of frozen sections in 73 cases of borderline tumor of ovary. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. 2009; 38:106-109
14) Brun JL, et al. Factors influencing the use and accuracy of frozen section diagnosis of epithelial ovarian tumors. Am J Obstet Gynecol. 2008;199:244
15) Storms AA, et al. Mucinous tumors of the ovary: diagnostic challenges at frozen section and clinical implications. Gynecol Oncol. 2012;125:75-9
16) Seidman JD, et al. Primary and metastatic mucinous adenocarcinomas in the ovaries. Incidence in routine practice with a new approach to improve intraoperative diagnosis. The American Journal of Surgical Pathology 2003;27:985-993
17) W. Pornsawan et al. The accuracy of intraoperative frozen sections in the diagosis of ovarian tumors. J Med Assoc Thai 2008; 91 (12):1791-5.
18) Cross P.A. et altri: Intraoperative frozen section analysis for suspected early-stage ovariancancer: 11 years of Gateshed Cancer Centre experience. Pubbliced on line 2011.
19) Prat J. New insights into ovarian cancer pathology. Annals of Oncology 2012;23:111-117
20) Kurman RJ, et al. Molecular Pathogenesis and Extraovarian Origin of Epithelial Ovarian Cancer. Shifting the Paradigm. Hum Pathol. 2011 July; 42(7): 918–931
21) Kurman et al. Blustein’s Pathology of the female genital tract (sixth edition)2011.
22) McCluggage WG. Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. Pathology 2011;43:420-432.
23) International journal of ginecological pathology; 2008, 27:161-174.

24) Immunohistochemisty in the diagnosis of metastatic carcinoma of unknown primary origin. R.T. Miller.April 30,2011

25) Lalwani N, et al. Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment. Radiographics. 2011;31:625-46

26) Tavassoli FA, et al. WHO Classification of tumours. Pathology and genetics. Tumours of the breast and female genital organs. IARC Press, Lyon 2003.