

Studio osservazionale di fattibilità e di performance del test congiunto germinale-somatico per la ricerca di mutazioni dei geni BRCA1-BRCA2 nel percorso diagnostico del tumore annessiale/peritoneale di alto grado non mucinoso.

**Acronimo: FAGESO** - Fasten BRCA germline/somatic test in ovarian cancer

Versione 1.0 del 05 maggio 2019

**Promotore:** Rete oncologica del Piemonte e della Valle d'Aosta

**Ospedali partecipanti:** AOU Citta' della Salute e della Scienza di Torino, FPO-IRCCS di Candiolo, AO Santa Croce e Carle di Cuneo, AO Nazionale SS, AO di Biella, AO Ordime Mauriziano Torino

**Servizi e figure professionali coinvolti:** patologo e biologo molecolare delle Anatomie Patologiche ginecologo oncologo con le strutture chirurgiche dei Centri di riferimento, genetista medico con il laboratorio di genetica, oncologo medico integrato nel Centro di riferimento.

La terapia con PARPi ha come primo effetto quello di inibire il funzionamento del sistema di riparazione a singola elica del DNA e di accumulare danni nel DNA della cellula tumorale.

Se i geni *BRCA1* o *BRCA2* sono mutati e non funzionanti, le lesioni accumulate vengono riparate dall'unico sistema di riparazione funzionante che è il NHEJ, introducendo mutazioni e alterazioni nella sequenza del DNA. Che portano la cellula tumorale alla morte.

**Questo è il principio alla base del concetto della “sintesi letale”, su cui si basa l'idea di somministrare la terapia con i PARPi a quelle pazienti che hanno mutazioni inattivanti nei geni *BRCA1* e *BRCA2*.**

**Le mutazioni germinali**, misurabili nel DNA estratto da un semplice prelievo di sangue dalla paziente sono importanti perché identificano alcune forme eredo famigliari di neoplasie mammarie ed ovariche. Donne con una mutazione patogenica in uno di questi geni a livello germinale hanno un rischio più alto della popolazione di sviluppare una forma di tumore al seno o all'ovaio.

**Le mutazioni somatiche**, cioè quelle che sono identificate solo ed esclusivamente nel DNA estratto dal tessuto tumorale (e non dal sangue della paziente) sono importanti a scopo terapeutico perché permettono di identificare quelle pazienti che meglio rispondono alla terapia con PARPi, secondo i concetti della “sintesi letale.”

È comunque opportuno sottolineare che **le donne con una mutazione germinale** in *BRCA1* o *BRCA2* che hanno sviluppato una neoplasia **hanno anche la stessa** mutazione nei geni *BRCA1* o *BRCA2* **nel tumore** e quindi sono eleggibili per una terapia con PARPi, **mentre non è vero il contrario.**

## 6. Obiettivi:

1. valutazione della fattibilità dell'invio contemporaneo dei campioni di sangue e tessuto tumorale il giorno della dimissione/2 giorni successivi delle pazienti operate per tumore ad alta /media probabilità di diagnosi come annessiale/peritoneale di alto/medio grado non mucinoso
2. valutazione della qualità del DNA estratto da sezioni paraffinate di tumore fornite dai centri partecipanti.
3. valutazione della qualità tecnica del test eseguito su tessuto tumorale e del *matching* dei due campioni in base alle varianti frequenti e rare dei due geni (indicatore: percentuale degli alleli varianti rispetto alla profondità di lettura)
4. validazione dei risultati ottenuti da estrazione su materiale fissato in paraffina rispetto ai risultati ottenuti su campione di tessuto tumorale fresco (limitatamente a IRCCS di Candiolo)

5. stima della concordanza tra diagnosi pre- e post- esame istologico definitivo (indicatore n° di casi eleggibili al test in base all'esame istologico definitivo / totale casi analizzati)
6. determinazione del n° di mutazioni BRCA germinali, somatiche con frequenza dell'allele mutato  $\geq 10\%$ , somatiche con frequenza  $< 10\%$  e al cut-off del 5%
7. determinazione del n° di mutazioni germinali identificabili attraverso il test somatico seguito dalla ricerca della specifica mutazione in campione genomico
8. determinazione del n° di casi nei quali sono riconoscibili 2 eventi mutazionali dei geni BRCA nel tessuto tumorale (cosiddetto *second-hit* : mutazione puntiforme + delezione / 2 mutazioni puntiformi)
9. impatto del percorso diagnostico sulla scelta terapeutica (indicatore n° casi nei quali la terapia di prima linea sarebbe stata diversa in base al risultato del test congiunto / totale casi analizzati)

## **MATERIALI E METODI**

**Pazienti:** sono eleggibili tutte le pazienti affette da Tumori Epiteliali Maligni dell'Ovaio (TMEO) sottoposte a procedure chirurgiche atte a ottenere un campione di tessuto neoplastico idoneo a essere sottoposto a indagine genetica.

Sono **escluse la pazienti** con TMEO istotipo mucinoso o TBM (tumori bordeline)

**Campioni:** tessuto neoplastico derivante da TMEO campionato dal Patologo di riferimento dell'Istituto cui viene conferito il pezzo operatorio che provvede ad escludere i tipo mucinoso e i TBM (borderline).

## **Campione (cont')**

Se non viene effettuato l'esame intraoperatorio, entro la dimissione della paziente si invia il materiale tessutale incluso in paraffina, senza attendere la diagnosi definitiva

- Dimensioni del campione: 3x3 cm (da definire) costituito solo dal tessuto neoplastico
- Tipo di fissazione: formalina al 10%.
- Il campione di sangue va comunque inviato al Laboratorio di Genetica Clinica Città della Salute e della Scienza (numero e caratteristica delle provette da definire)

## **1: raccolta dei campioni**

1a. Se all'atto operatorio viene fatta diagnosi di CARCINOMA DI ALTO GRADO, si esegue subito un prelievo di tessuto tumorale per l'inclusione e l'esecuzione di sezioni da inviare al centro di biologia molecolare (Città della Salute e Candiolo sulla base di accordi da definire).

## **. 2. Spedizione del materiale in modo congiunto alla Genetica Medica dell'AOU Città della Salute e della Scienza di Torino e/o Candiolo.**

Nel momento della conferma dell'idoneità del materiale si procederà all'invio dei campioni istologici e di sangue con allegata richiesta al Centro che eseguirà l'analisi di *BRCA* secondo le diverse possibili modalità:

1. Invio congiunto dei campioni di DNA estratti da campione di sangue periferico e da sezioni relative a blocchetto in paraffina.
2. Invio congiunto del campione di sangue periferico e delle sezioni relative a blocchetto in paraffina.
3. Invio del DNA estratto dal campione di sangue periferico al momento dell'intervento (ovvero entro la dimissione della paziente) e invio differito del DNA estratto dal blocchetto in paraffina al momento della firma dell'esame istologico definitivo in un tempo utile per adeguata refertazione ed eventuale trattamento della paziente.

### **3. Esecuzione dell'analisi genetica sia su sangue che su tessuto.**

3a. La diagnostica su sangue periferico, SE E' RICHIESTO DAL MEDICO RIENTRANDO NEI CRITERI ORMAI DI CONSUETA PRATICA CLINICA, seguirà la stessa procedura.

3b. Se non c'è il sospetto, trattandosi di uno studio osservazionale di validità analitica che non prevede il coinvolgimento delle pazienti, seguirà le procedure della sperimentazione, ma IN CASO DI FONDATA EVIDENZA DI UNA MUTAZIONE VERRA' SEGNALATO AL MEDICO CHE HA LA PAZIENTE IN CURA PER LA VALUTAZIONE COLLEGIALE DEL CASO CHE A SUA VOLTA PROCEDERA' ALLA FORMALIZZAZIONE DELLA RICHIESTA.

3c. La diagnostica su tessuto sarà di tipo sperimentale, ma in caso di FONDATA EVIDENZA DI UNA MUTAZIONE verrà seguita la stessa procedura del punto b.

#### **4. Istituzione di una piattaforma per l'inserimento di tutti i dati**

I dati potranno essere inseriti sulla piattaforma in uso per lo studio AUDTI Ovaio dal momento che è già prevista la possibilità di registrare l'effettuazione o meno della determinazione del BRCA.

Un database ad hoc dovrà essere gestito per lo studio in essere e che dovrà essere implementato nel corso dello studio stesso da parte di una risorsa attivata mediante un contratto da definire.

### **5. Tempistica di invio da definire.**

Il campione di sangue e di tessuto devono pervenire al laboratorio di riferimento entro e non oltre le tre settimane dalla data dell'intervento al fine di avere il risultato finale delle analisi entro la data prevista per il secondo ciclo di chemioterapia di prima linea.

## 7. Aspetti etici:

1. Trattandosi di studio osservazionale di validità analitica il progetto non prevede il coinvolgimento delle pazienti poiché la richiesta del test BRCA su campione di sangue rientra nella pratica medica di *routine* a fronte di un ragionevole sospetto clinico da parte del Medico richiedente.
2. In caso di fondate evidenze a supporto della presenza di una mutazione somatica del gene BRCA, in assenza di mutazione germinale, il dato verrà segnalato al Medico richiedente per la valutazione collegiale del caso.
3. Si rende indispensabile che per le pazienti trattate nelle Istituzioni che partecipano a questo studio si richieda il consenso alla determinazione della mutazione somatica del BRCA contestualmente a quella germinale motivandola con la necessità di verificare la concordanza delle due procedure.
4. Inoltre le SC di Anatomia Patologica partecipanti devono chiedere l'autorizzazione a inviare campioni in un laboratorio di riferimento per il test genetico peraltro così definito da delibera regionale.

## 8. Costi:

1. I costi del test somatico sono stati calcolati come pari a 250,00 € a campione di soli reagenti;
2. è possibile sperimentare il test somatico sia presso il laboratorio di Città della Salute sia presso il Laboratorio di Anatomia Patologica di FPO-IRCCS di Candiolo;
3. si prevede necessario lo stanziamento di fondi per un borsista dedicato al progetto, sia per la parte analitica sia per gestione dati ;
4. si prevede necessario lo stanziamento di fondi per un servizio di spedizione tramite corriere.

## 9. FINANZIAMENTI

Lo studio potrebbe veder la partecipazione della Rete Oncologica Piemonte e Valle d'Aosta e il concorso delle Aziende Sanitarie coinvolte motivata dal fatto che la certificazione del livello di positività del test somatico mira ad **evitare trattamenti non congrui** con la presenza di mutazione.

Inoltre la **definizione di un cut-off di corrispondenza** tra mutazione definita su sangue e quella determinata su tessuto neoplastico **non è ancora presente nella letteratura** disponibile e sarebbe di rilevante importanza sia per la conoscenza che per la pratica clinica corrente.