



Università Politecnica delle Marche

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina e Chirurgia

Tesi Sperimentale
in Genetica Oncologica

**Mutazioni germinali e basi molecolari
della Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome
e della sindrome di Lynch**

**Germline Mutations and Molecular Basis of Hereditary Breast and
Ovarian Cancer Syndrome and Lynch Syndrome**

Relatore: Chiar.ma
Prof.ssa Rossana Berardi

Tesi di laurea di:
Giacomo Grilli

Correlatore: Chiar.mo
Prof. Riccardo Giampieri

A.A. 2025/2026

A Maria Pia e Luciano

A Simone

Abstract:

Il cancro della mammella rappresenta la neoplasia a più frequente insorgenza nella popolazione femminile, circa 1 donna su 8 si ammala di cancro mammario. Si stima che il 5 – 10% dei tumori mammari sia connesso a forme ereditarie, cioè a tumori correlati a mutazioni genetiche germinali che possono aumentare il rischio di insorgenza di neoplasia, rispetto alla popolazione generale. I geni connessi all'insorgenza del cancro mammario sono associati a diversi tipi di neoplasie, primo fra tutti il cancro ovarico, costituendo un vero e proprio spettro neoplastico, definendo un quadro sindromico, l'HBOC Syndrome (Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome). I geni maggiormente coinvolti sono rappresentati da BRCA1 e BRCA2. La Sindrome di Lynch rappresenta la più frequente condizione di forme non poliposiche di cancro colon – rettale connessa a predisposizione genetica. La consulenza di genetica oncologica, il test genetico e la consulenza post – test sono strumenti indispensabili per individuare i soggetti a rischio di sviluppare neoplasie associate a Sindrome HBOC e Sindrome di Lynch e definire percorsi di sorveglianza o trattamento specifici. Il presente studio si è posto l'obiettivo di identificare e valutare la prevalenza delle mutazioni a carico dei geni per la Sindrome HBOC e Lynch, in pazienti selezionati e sottoposti a test genetico. Sono stati sottoposti a test genetico 538 pazienti. Il presente studio ha messo in luce un'età alla prima diagnosi di neoplasia precoce nei soggetti sottoposti a test, suggerendo una possibile anticipazione dell'insorgenza di neoplasia in soggetti con possibile predisposizione a sindromi eredo – familiari. Il presente studio non ha evidenziato una significativa differenza fra l'età alla prima diagnosi di tumore e la mutazione presente nei soggetti con test positivo, dato che necessita di approfondimento, in quanto in controtendenza rispetto alle evidenze attuali. Dalla nostra analisi è emersa una differenza statisticamente significativa sulla presenza di mutazioni tipiche della Sindrome di Lynch e gli altri assetti mutazionali considerati congiuntamente (BRCA, HRD non BRCA e co – mutazione BRCA più HRD – non BRCA) e la diagnosi di carcinoma mammario come prima neoplasia ($p = 0.0037$). Il nostro studio ha confermato la maggiore probabilità di trovare mutazioni positive per i geni correlati alla Sindrome HBOC nei soggetti con familiarità di primo grado ($p = 0.0003$). Dato analogo è stato riscontrato in pazienti con familiarità per tumori dello spettro Lynch ($p = 0.0078$). Infine, abbiamo evidenziato una differenza di età alla prima diagnosi fra i soggetti sottoposti a test con diagnosi di neoplasia multipla e singola diagnosi; tuttavia, non è stata evidenziata una differenza significativa in relazione al tipo di mutazione. In conclusione, il nostro studio ha permesso di valutare l'importanza del test genetico come strumento per identificare una predisposizione all'insorgenza del cancro in soggetti con familiarità per HBOC e Lynch, nonché informazioni utili da applicare alla clinica riguardanti l'età alla precoce di prima diagnosi la correlazione con diagnosi di tumori multipli e la correlazione di mutazioni dello spettro HBOC e il cancro mammario.

Indice:

1. INTRODUZIONE:	1
1.1. CANCRO DELLA MAMMELLA:	1
1.1.1. Epidemiologia del cancro mammario:	1
1.1.2. Fattori di rischio per il carcinoma della mammella:	2
1.1.3. Suddivisione istologica e profili molecolari del cancro della mammella:	5
1.1.4. Strumenti di classificazione della prognosi su base genomica:	7
1.1.5. Iter diagnostico e stadiazione del carcinoma della mammella:	10
1.1.6. Trattamento e follow – up del cancro mammario in situ:	14
1.1.7. Trattamento e follow – up del cancro mammario in stadio precoce:	15
1.1.8. Trattamento e follow – up del cancro mammario in stadio avanzato:	17
1.1.9. Screening del cancro mammario:	18
1.2. CANCRO DELL’OVAIO	18
1.2.1. Epidemiologia del cancro ovarico:	18
1.2.3. Biologia molecolare e fattori di rischio e protettivi del cancro ovarico:	19
1.2.5. Stadiazione del cancro dell’ovaio:	22
1.2.6. Trattamento e follow – up del cancro ovarico:	24
2. MUTAZIONI SULLA LINEA GERMINALE NELLA HBOC SYNDROME E NELLA SINDROME DI LYNCH:	26
2.1.1. Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome (HBOC Syndrome):	26
2.1.2. Basi molecolari della Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome:	29
2.1.5. Patogenesi e rischio legato ad altri geni frequentemente mutati nella HBOC Syndrome:	36
2.1.6. Ereditarietà del cancro e prevenzione:	42
2.1.7. CGO (Consulenza di Genetica Oncologica) – pre - test:	43
2.1.8. Test genetico di laboratorio:	43
2.1.9. Risultato del test e counseling post – test:	44
2.1.10. Criteri di invio alla consulenza genetica e aspetti relativi al test:	45
2.1.11. Management operativo dei pazienti affetti da mutazioni predisponenti all’HBOC:	48
2.1.12. Sorveglianza dei pazienti affetti da mutazioni predisponenti all’HBOC :	51
2.1.13. Sindrome di Lynch:	52
2.1.14. Basi molecolari della Sindrome di Lynch:	52
2.1.15. Test molecolari per la valutazione del deficit del complesso MMR:	53
2.1.16. Management dei pazienti affetti da Sindrome di Lynch:	56
3. OBIETTIVI DELLO STUDIO:	56
4. PAZIENTI E METODI UTILIZZATI:	57
4.1.1. Criteri di inclusione nello studio:	57
4.1.2. Analisi statistica e detection rate:	58
4.1.3. Next Generation Sequencing (NGS):	59
4.1.4. NGS e Ion Torrent Technology:	61
5. RISULTATI:	61
5.1.1. Analisi di tutta la popolazione che ha svolto il test genetico:	61
5.1.2. Distribuzione dell’età all’esecuzione del test genetico:	62
5.1.3. Distribuzione dell’età dei soggetti sottoposti a test genetico alla prima diagnosi oncologica:	63
5.1.4. Confronto della mediana dell’età alla prima diagnosi oncologica tra pazienti con diagnosi singola di neoplasia e pazienti con diagnosi multipla di neoplasia:	64
5.1.5. Confronto della mediana dell’età alla prima diagnosi oncologica tra pazienti con mutazioni dei geni BRCA e mediana dell’età alla prima diagnosi di tumore con mutazione di altri geni:	65
5.1.6. Confronto della mediana dell’età alla prima diagnosi oncologica tra pazienti con mutazioni di geni non BRCA e non correlati alla Sindrome di Lynch e mediana dell’età alla prima diagnosi di tumore con mutazione di geni correlati alla Sindrome di Lynch:	66
5.1.7. Confronto della mediana dell’età alla prima diagnosi oncologica tra pazienti con mutazioni di geni correlati alla Sindrome HBOC e mediana dell’età alla prima diagnosi di tumore con mutazione di geni correlati alla Sindrome di Lynch:	68
5.1.8. Risultato del test genetico in relazione all’ereditarietà per HBOC:	69
5.1.9. Risultato del test genetico in relazione all’ereditarietà per Sindrome di Lynch:	71
5.1.10. Prevalenza di tumori multipli in relazione alla mutazione genetica rilevata:	72

5.1.11. Prevalenza nei pazienti testati del tumore mammario come prima diagnosi di neoplasia in relazione alla mutazione genetica rilevata:	74
6. DISCUSSIONE:.....	75
7. CONCLUSIONI:	77
8. BIBLIOGRAFIA:	78

1. INTRODUZIONE:

1.1. CANCRO DELLA MAMMELLA:

1.1.1. Epidemiologia del cancro mammario:

L'American Cancer Society ha stimato, come proiezione per il 2026, il numero di nuovi casi di tumore negli Stati Uniti in 2.144.850 dei quali 1.020.780 nel sesso femminile e 1.094.070 nel sesso maschile. I nuovi casi di cancro della mammella sono stati prospettati in 324.580 , dei quali 2670 in individui di sesso maschile e 321.910 in individui di sesso femminile[1]. Questi dati mostrano un aumento nella stima di nuovi casi di cancro al seno rispetto a quanto riportato dall'OMS mediante il GCO (Global Cancer Observatory) per l'anno 2022, in cui i nuovi casi di cancro della mammella negli Stati Uniti sono risultati essere 274.375, rappresentando l'11.5% del totale di nuovi casi di tumore. La mortalità è stata di 42.900 casi, il 7.1% delle morti per tumore e in assoluto la quarta causa di morte per neoplasia[2]. A livello femminile il cancro mammario è risultata la prima neoplasia per incidenza di nuovi casi, rappresentando il 25% sul totale. In Italia l'OMS ha stimato l'incidenza di cancro della mammella per l'anno 2022 in 57.480 casi, il 13.2% sul totale dei nuovi casi di tumore, in assoluto prima tipologia di neoplasia per incidenza, con una mortalità di 15.455 casi, pari all'8% sul totale dei decessi[2]. Nel sesso femminile è risultata essere la prima neoplasia per incidenza, con una percentuale sul totale del 28,2%. In linea sono i dati presentati per l'anno 2025 in Italia utilizzando i database disponibili nei registri AIRTUM:

- Incidenza stimata di 362.100 nuovi casi di tumore, di cui 179.800 nelle donne e 182.300 negli uomini.
- I nuovi casi di tumore mammario prospettati risultano 55.900, il 31.1% sul totale dei nuovi casi di tumore nella donna e il 15.4% in assoluto dei casi di neoplasia, con ASR= 159/100.000 nel sesso femminile[3]. Dati in linea, con leggere differenze sono stati prospettati dall'European Cancer Information System (ECIS)[4].

- Dalla stima effettuata il cancro del colon è risultata la seconda neoplasia per incidenza nella donna con 18.900 casi (ASR = 47.4) e il cancro del polmone la terza con 16.400 nuovi casi (ASR = 41.0).
- Nel sesso maschile la prostata risulta essere la prima neoplasia per incidenza, con 31.200 nuovi casi (ASR= 92.3), il 17.1% dei casi di tumore maschile, seguita dal polmone con 27.100 casi (ASR=80.9) e infine dalla vescica e colon – retto rispettivamente 23.100 e 22.800 nuovi casi.

Le proiezioni effettuate basandosi sui database AIRTUM mostrano, rispetto al periodo 2013 – 2017, utilizzato per comparare l'incidenza di nuovi casi di tumore prospettati per l'anno 2025, un trend in aumento del + 7,7% dei casi di tumore, in entrambi i sessi, ma con una diminuzione dei tassi di incidenza standardizzati (ASR – Age Standardised incidence Rate) per il cancro al polmone nel maschio (- 16%), correlato ad una costante diminuzione di utilizzo del tabacco dagli anni '60 ad oggi, nel colon retto (- 18%), in relazione alla maggiore aderenza allo screening e nella prostata (- 24%), dato che però potrebbe essere stato influenzato da una minor attenzione e/o pressione nello screening, a fronte di un aumento dell'ASR di cancro al pancreas, melanoma e cancro testicolare[3]. Nella donna si evidenzia un + 7% dell'ASR per la neoplasia mammaria e per la neoplasia del polmone, con trend in diminuzione per il colon – retto (- 12%) e per lo stomaco (- 15%)[3].

1.1.2. Fattori di rischio per il carcinoma della mammella:

Tra i fattori di rischio correlati all'insorgenza del cancro della mammella possiamo definirne alcuni imm modificabili:

- Sesso femminile: prevalentemente correlata ad un alto livello di estroprogestinici circolanti, nonché un tessuto maggiormente rappresentato e sensibile alla componente ormonale. Il tumore alla mammella nel maschio rappresenta meno dell'1% dei casi, con una correlazione maggiore a Sindrome di Klinefelter, iperestrogenismo, familiarità[5][6].
- Età avanzata: prevalentemente correlata all'accumulo di alterazioni nel genoma cellulare dovuto all'esposizione a fattori cancerogeni. Il 40% dei pz con cancro al seno ha un'età superiore ai 65 anni, con un picco di tumori Luminal – A, associati a prognosi migliore, rispetto ai triplo – negativo associati ad un'età di insorgenza inferiore[5][6].
- Familiarità: circa il 13 – 19% dei soggetti con carcinoma mammario presentano una storia familiare alle spalle per neoplasia della mammella, con un familiare di primo grado positivo[5];

- Razza/etnia: abbastanza discussa e non chiara l'associazione fra etnia e insorgenza del cancro mammario, ma dati riportati dall'American Cancer Society identificano le donne bianche non ispaniche come le maggiormente colpite dal cancro al seno (tasso di incidenza = 128.1/100.000, con una mortalità di 21.9/100.000), la mortalità maggiore è invece raggiunta dalle donne di colore non ispaniche (tasso di mortalità = 31/100.00), seppur queste presentino un'incidenza inferiore. Incidenza nettamente inferiore e contestualmente mortalità inferiore presentano le donne ispaniche e le donne asiatiche e/o delle regioni del Pacifico[7].
- Genetica: una genetica positiva, specialmente su geni quali BRCA1/BRCA2, aumenta il rischio di insorgenza di cancro al seno in maniera importante, molti di questi geni presentano, se mutati in eterozigosi sulla linea germinale, un rischio stimabile matematicamente; similmente, mutazioni ad alta penetranza su geni come TP53, PTEN, CDH1, STK11 o a moderata penetranza, come PALB2, ATM, CHEK2[5][8].
- Gravidanza: numerosi studi hanno associato la gravidanza, specialmente fra la seconda e la terza decade della vita (in particolare < 24 aa[9]) come un fattore protettivo nei confronti del cancro al seno, con una diminuzione del life - time risk di sviluppare una neoplasia mammaria[5][9]; similmente, il rischio diminuisce ulteriormente con gravidanze successive, indicando la multiparità come un fattore protettivo. La forte protezione delle donne primipare/multipare rispetto alle nullipare deriverebbe dalla presenza di cellule staminali differenti nei lobuli ghiandolari della mammella, in particolare in prossimità della menopausa. La presenza di cellule staminali suscettibili alla carcinogenesi, alimentata dagli ormoni estroprogestinici, caratterizzerebbe i lobuli, definiti Lob1, sede per l'appunto della componente staminale e persistenti anche in peri/post menopausa [9], a differenza dei lobuli differenziati, Lob2 – Lob3, che coinvolgono completamente. Nelle donne multipare, tali cellule staminali sarebbero state sostituite da un genotipo meno suscettibile alla carcinogenesi: la gravidanza precoce sembrerebbe permettere il differenziamento verso staminali, che seppur mantenendo capacità proliferativa, avendo già subito un primo ciclo di differenziamento, presentano una “firma genetica” maggiormente prona al riparo del danno e alla resistenza ai carcinogenesi, seppur comunque sensibili a grossi stimoli trasformanti[9]; queste ipotesi hanno trovato riscontro in modelli murini[9] e collimano con le evidenze cliniche di una minor suscettibilità al cancro nelle donne primipare/multipare rispetto alle nullipare.
- Allattamento, menopausa e menarca: l'allattamento al seno ha mostrato forti evidenze protettive nei confronti dell'insorgenza del cancro al seno, in particolare è stata messa in luce la riduzione di neoplasia ER/PR +/- in relazione alla maggior durata dell'allattamento al seno.

La menopausa precoce, chirurgica o para-fisiologica (POF) si è mostrato un fattore protettivo, al contrario un menarca in età precoce è risultato essere correlata ad un rischio maggiore[9].

- Precedente storia di neoplasia mammaria.
- Precedente terapia radiante della mammella.
- Caratteristiche istologiche del seno: mammelle con una densità maggiore, maggiormente osservati nelle donne giovani, con basso BMI o in trattamento con HRT è risultato essere maggiormente prone all'insorgenza del cancro[9].

Altri fattori sono definiti modificabili:

- HRT (Hormonal Replacement Therapy): vale la pena ricordare come sia la terapia contraccettiva, sia l'HRT rappresentano un fattore di rischio per il cancro al seno. Un ampio studio pubblicato sul New England Journal of Medicine[10] ha messo in luce come le donne che utilizzano terapia anticoncezionale di natura ormonale, indipendentemente dal presidio utilizzato, presentano un rischio di cancro aumentato rispetto alle donne che non ne fanno uso $aRR = 1.20$ (95% CI, 1.14 to 1.26), $p - value = 0.002$ [10]; inoltre, è stato messo in luce come tale rischio cresca con il tempo di utilizzo della terapia anticoncezionale (donne che hanno utilizzato la terapia per > 10 anni $aRR = 1.38$ (95% CI, 1.26 to 1.51). Seppur con alcune piccole limitazioni lo studio fornisce un'associazione fra terapia anticoncezionale e aumentato rischio di cancro al seno. Per quanto riguarda l'utilizzo di HRT diversi studi hanno messo in evidenza una correlazione con l'aumentato rischio di cancro al seno [5][11][12], in particolare nelle donne che ne fanno utilizzo come *long – term users* e/o ne hanno fatto utilizzo recente[12].
- L'attività fisica rappresenta un fattore protettivo, in particolare l'attività ad alta intensità, intesa come $> 1h/die$ di cammino è stata associata ad una diminuzione del rischio di insorgenza di cancro della mammella del 23% ($HR_{adj} = 0.77$, 95% CI 0.66–0.90)[14], particolarmente nelle donne in post – menopausa e peri – menopausa, associazione non confermata nelle donne in pre – menopausa.
- Obesità, sovrappeso.
- Alimentazione: a livello alimentare è stato messo in evidenza il ruolo pro – cancerogeno degli alimenti ultraprocesati, con un rischio di aumento del cancro di circa il 10% ad ogni incremento del 10% sulla propria alimentazione giornaliera e di un 11% nello specifico per il cancro al seno[13][5]. Al contrario, una dieta ricca di vegetali, frutta, fibre e proteine magre è associata ad una riduzione del rischio di cancro[5].
- Consumo di alcol.

- Fumo.
- Farmaci, esposizione a inquinanti chimici.

1.1.3. Suddivisione istologica e profili molecolari del cancro della mammella:

L'attuale suddivisione istologica del cancro della mammella è aggiornata al 2019 ed è stata stilata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità e prevede innumerevoli tipi istologici, alcuni associati a frequenza maggiore o a prognosi migliore/peggiore. I principali tipi istologici epiteliali di frequente incontro nella patologia della mammella sono:

- NST (No Special Type): rappresenta tra il 70% e l'80%[5][15][16] di tutti i casi e raggruppa una serie di entità istologiche che non hanno i requisiti per essere classificate come "Special Type". Rappresentano cordoni solidi, altre volte gruppi o trabecole di cellule atipiche che infiltrano la componente stromale[5][15].
- Istotipo lobulare: 5 – 15% delle diagnosi di tumore mammario, costituito da filiere di cellule poco coese, la forma pleomorfica ha prognosi peggiore[15][16].
- Tutte le altre forme, che presentano un pattern specifico superiore al 50% della loro struttura, vengono definite "speciali" o "special type"[15]. Fra queste vale la pena ricordare:
- Il carcinoma tubulare, caratterizzato da tubuli beanti, con desmoplasia stromale, prognosi favorevole e correlato all'età anziana. Rappresenta il 2% circa delle neoplasie mammarie maligne [15][16].
- Il carcinoma mucinoso presenta cellule disperse in laghi di muco, ha prognosi favorevole [15][16].
- Fra gli istotipi a prognosi infausta vale la pena ricordare il carcinoma infiammatorio, caratterizzato da forte edema ed infiammazione cutanea, con progressione rapida e infausta, similmente al carcinoma midollare, ricco di atipie e mitosi cellulari[15][16].
- Diversi altri istotipi presentano bassa frequenza di presentazione.

Una seconda classificazione che ha assunto un'importanza focale, sia dal punto di vista di indirizzo terapeutico, sia prognostico, prevede la tipizzazione molecolare della neoplasia, suddividendola:

- Luminal A: tumori caratterizzati da positività per i recettori estrogenici (HR +), progestinici (PgR +, > 20% sul totale delle cellule), negatività per ErbB2 (HER2 -), e un indice di proliferazione basso, valutato con la reazione Ki67 – MIB1 (< 20% sul totale delle cellule)[5]. Questo profilo immunofenotipico è associato, a livello prognostico, a tumori con un comportamento generalmente meno aggressivo, una disseminazione maggiormente orientata

verso l'osso e un tasso di ricadute minore rispetto ai Luminal B[17][18]. I sottotipi Luminal A sono stati associati nettamente ad una minor frequenza di mutazioni per il gene P53 rispetto a tumori di natura più aggressiva quali Luminal B, HERB +, Basal – like [17]. Un ulteriore fattore terapeutico correlato alla presenza dei recettori estroprogestinici positivi è la possibilità di giovare di terapia endocrina[18].

- Luminal B: sono neoplasie suddivise in HER2 + e HER2 -, quest'ultime caratterizzate dalla positività per i recettori estrogenici (HR +), negatività per i recettori progestinici (PgR -, cutoff < 20%), negatività per HER2 e Ki – 67 generalmente elevato (cutoff > 20%). Negli HERB2 +, avremo le seguenti caratteristiche: HR +, PgR +/- (cutoff al 20%), HERB + e Ki – 67 alto o basso (cutoff al 20%)[6][15]. Questi tumori presentano una risposta incompleta all'ormonoterapia e la CHT può essere presa in considerazione, negli HER2 + si può affiancare un trattamento che blocchi l'attività del recettore; in particolare risulta, così come mostrato da S. W. M. Lammers e at[18], che:
- I soggetti con tumore Luminal B hanno un tasso di insorgenza di metastasi notevolmente maggiore rispetto ai Luminal A nei primi 0 – 5 anni dalla diagnosi, ma una differenza non significativa nel periodo compreso fra i 5 e i 15 anni dalla diagnosi.
- I soggetti con tumore Luminal B hanno una mortalità maggiore nei primi 0 – 5 anni, rispetto ai Luminal A, similmente vi è una debole associazione per la fascia compresa fra i 5 – 15 anni dalla diagnosi.
- I soggetti con tumore Luminal B hanno una mortalità specifica per cancro alla mammella superiore ai soggetti Luminal A e una sopravvivenza complessiva (OS – Overall Survival) peggiore nella fascia compresa fra gli 0 e i 5 anni dalla diagnosi.

Vale la pena sottolineare come pazienti Luminal A trattati con Anastrozolo mostrino un maggior beneficio nell'utilizzo del farmaco rispetto ai soggetti Luminal B[18]. In un ulteriore studio, l'utilizzo del Tamoxifene è stato associato ad un beneficio maggiore per i soggetti con tumore Luminal A rispetto ai soggetti con tumore Luminal B[19] sul lungo periodo; tuttavia, la terapia ormonale con tamoxifene ha mostrato un notevole diminuzione del rischio nei soggetti Luminal B nei primi 5 anni dopo la diagnosi per quanto riguarda il DFRI (Distant Recurrence Free – Interval), probabilmente, tale effetto, meno evidente nel *long term use* è legato alla intrinseca maggiore attività proliferativa di queste neoplasie e alle molteplici vie che spingono il ciclo cellulare[19].

- HER2 enriched: tumori caratterizzati da negatività per i recettori estroprogestinici e positività per HER2 (HR –, PgR –, HER2 +).

- Triple Negative: tumori suddivisi in basal – like e non – basal, i primi caratterizzati da HR -, PgR -, HER2 -, CK5/6 +, mentre i secondi sono CK5/6 negativi.

1.1.4. Strumenti di classificazione della prognosi su base genomica:

Risulta ormai consolidato nella pratica clinica l'utilizzo di test genomici che definiscano un preciso assetto a carico dei geni del tessuto canceroso. Questa “firma genetica” permette il calcolo del rischio di recidiva e l'aggiustamento della terapia al fine di minimizzare il rischio stesso e ottimizzare il trattamento del cancro. Così come strutturato dalle linee guida AIOM vi sono 5 test genetici con la maggior validazione clinica:

- Prosigna[®];
- MammaPrint[®];
- OncotypeDX[®];
- Breast Cancer Index[®];
- Endopredict[®].

Di questi, 2 hanno ottenuto una raccomandazione nell'esecuzione con livello di evidenza pari a IA: OncotypeDX[®] e MammaPrint[®], basandosi sui dati di tre studi prospettici e randomizzati:

- TAILORx e RxPONDER hanno valutato OncotypeDX[®], in entrambi i casi randomizzando soggetti HR +/PgR+ e HERB2 -, con parametro N, nel primo caso pari a N0 e nel secondo ad N1.

Tabella 1. Principali caratteristiche dei trial clinici randomizzati sui test genomici linee guida AIOM – Carcinoma mammario in stadio precoce, 2023[6]:

Studio (u):	Test genomico:	Popolazione randomizzata:	Risultati endpoint Primario:	Altri risultati:
TAILORx (1626 ^a)	Oncotype DX [®]	HR+ / HER2 - / N0 RS = 11-25	Non-inferiorità (DFS) di ET vs CT+ET	Tassi sovrapponibili di D-DFS, L-DES, OS tra ET vs CT + ET donne <50 anni ed RS 16 – 25: CT + ET > ET (D-DFS)

SWOG S1007 RxPONDER (5083)	Oncotype DX®	HR+ / HER2 - / N1 RS ≤25	Test di interazione tra gruppo di trattamento e RS non significativo	Donne pre-menopausa: CT + ET associate a iDFS più favorevoli rispetto a ET Donne post-menopausa: nessuna differenza significativa in iDFS tra ET e CT + ET
MINDACT (1550 ^b)	MammaPrint®	HR+/HER2-N0- 1 Alto rischio clinico + basso rischio genomico	Non inferiorità (MFS) di EI vs CI+ET –	

a. Numero di pazienti randomizzate a ricevere ET vs CT+ET.

b. Numero di pazienti ad alto rischio clinico + basso rischio genomico randomizzate a ricevere ET vs CT+ET.

Abbreviazioni: CT, chemioterapia; ET, terapia endocrina; HR, recettori ormonali; MFS, metastasis-free survival;

iDFS, invasive disease-free survival; RS, recurrence free survival.

Uno studio pubblicato sul New England Journal of Medicine (J.A. Sparano et al)[23], basandosi sui dati ottenuti da 9719 pazienti, HR + , PgR + , HER2 -, N0, di cui il 69% ha ottenuto un RS compreso fra 11 e 25, a cui casualmente è stata somministrata ET o CHT + ET, ha mostrato:

- Una non inferiorità dell'endocrinoterapia rispetto alla chemio – endocrinoterapia, in relazione all'HR per l'iDFS (invasive Disease Free Survival).
- Tassi di sopravvivenza libera da malattia (DSF) sovrapponibili fra i soggetti che avevano ricevuto ET ed CHT – ET (83.3% vs 84.3%).
- Lieve beneficio ottenuto da pazienti con età ≤ 50 anni e RS compreso fra 11 e 25.

I dati ottenuti collimano con quelli dello studio TAILORx[23].

Così come mostrato da K. Kalinsky et al[24], donne con carcinoma HR + , PgR+, HER2 -, N1 (0 – 3 linfonodi positivi per malattia) e RS < 25, casualmente randomizzate in due gruppi, il primo trattato con solo ET, mentre il secondo con CHT – ET, risulta che:

- Nelle donne in post – menopausa, il DFS a 5 anni risulta pari al 91.3% in soggetti trattati con sola ET e del 91.9% in soggetti trattati con CHT – ET.
- Nelle donne in pre – menopausa la DSF a 5 anni risulta pari all'89% nelle pazienti trattate con sola ET e del 93.9% nelle donne trattate con CHT – ET.

Anche in questo caso i risultati collimano con quelli ottenuti nel trial RxPONDER, mettendo in luce un effetto positivo della CHT – ET nelle donne in pre - menopausa con RS <25[24].

OncotypeDX® rappresenta un saggio condotto su 21 geni differenti: 16 sono geni bersaglio di alterazioni generalmente espresse a livello del tessuto canceroso, mentre 5 rappresentano i geni di riferimento con cui vengono normalizzati gli altri 16[21]. Il test è indicato in tutte le pazienti con carcinoma in stadio precoce HR + / PgR +, HER2 – e con linfonodi negativi (N0) o positivi (≤ 3), N1[20][21]. Il test restituisce una variabile, continua (con valori possibili da 0 a 100) del rischio di recidiva nei 9 anni successivi alla diagnosi, il “Recurrence Score”. Il test prevede l’utilizzo di tessuto mammario neoplastico paraffinato, da cui viene estratto, quantificato e purificato l’RNA corrispondente ai 21 geni in analisi, cui segue una qRT – PCR e il calcolo mediante uno specifico algoritmo del “Recurrence Score”[21]. I geni attualmente testati possono essere così suddivisi[22]:

- Correlati alla proliferazione cellulare: Ki – 67, STK15, Survivin, CyclinB1, MYBL2.
- Correlati a componente estro – progestinica: ER, PgR, Bcl2, SCUBE2.
- Correlati ad invasione tissutale: Stromelysin 3, Cathepsin L2.
- Correlati ad HER2: HER2, GRB7.
- Altri: GSTM1, BAG1, CD68.
- Riferimento: β – actin, GAPDH, RPLPO, GUS, TFRC.

Le indicazioni attuali riguardo il loro utilizzo in ambito clinico ci dicono che questi test andrebbero utilizzati in tutta quella zona grigia di pazienti con neoplasia stadiata mediante criteri clinici, istopatologici e strumentali in stadio I – IIIA, HR+/HER2- con stato linfonodale N0 – N1[6] e in ogni caso, il test genomico per la stratificazione del rischio non è raccomandato in soggetti a BASSO o ad ALTO rischio di ricorrenza, così come specificato dalle linee guida AIOM[6].

Tabella 2. Definizione di basso e alto rischio, linee guida AIOM – Carcinoma mammario in stadio precoce, 2023[6]:

BASSO RISCHIO	ALTO RISCHIO
Le seguenti 5 caratteristiche:	Almeno 4 delle seguenti caratteristiche:
G1	G3
T1 (a – b)	T3 – T4
Ki67 <20%	ER <30%
N0	Ki67 >30%

*In caso di T1a non è indicato l'accesso al N+ (> 3 linfonodi NON indicazione al test) test in presenza di almeno altri 2 parametri favorevoli

Questo perché le pazienti a basso rischio sono candidate ad ormonoterapia adiuvante esclusiva, mentre le pazienti con alto rischio a CHT e ormono adiuvante post – chirurgica. Il test viene eseguito su campione paraffinato, dopo aver deciso congiuntamente con la paziente in relazione alle linee guida, all'opinione e all'esperienza del team multidisciplinare e alla volontà stessa dell'assistita. L'utilizzo delle firme genomiche non è altresì consigliato per decidere se estendere la terapia adiuvante ormonale, per scarse evidenze al riguardo[6]. Va in ultimo tenuto in considerazione, come espresso durante la conferenza di St. Gallen del 2021 dal panel degli esperti, il valore dei test genomici come un utile strumento per decidere se adottare un trattamento chemioterapico in soggetti in cui venga presa in considerazione (HR+/HER-, N0 – N1, ma non N2, in cui la CHT è standard)[6].

1.1.5. Iter diagnostico e stadiazione del carcinoma della mammella:

Le linee guida ESMO raccomandano l'esecuzione di ECO – mammografia bilaterale per identificare lesioni potenzialmente sospette individuate mediante l'esame obiettivo. La Mammografia in tomosintesi (maggiormente indicata in soggetti con carcinoma mammario sintomatico[6]) o la mammografia con mdc potrebbero essere usate come alternative[6], uno studio pubblicato su Lancet Oncology da *Bernardi et al*[25] ha evidenziato un maggior detection rate (8,5 per 1000) alla Mammografia in tomosintesi (2D - 3D *dual acquisition*) rispetto alla mammografia tradizionale in 2D (6,3 per 1000), similmente la mammografia 2D ricavata dalle immagini ottenute mediante la tomosintesi (2D synthetic – 3D Mammography), ha mostrato una maggiore capacità di individuare il cancro (8,8 per 1000); tuttavia, lo studio ha evidenziato anche un maggior numero di falsi positivi a carico della mammografia 3D e della 2D Synthetic Mammography rispetto alla mammografia tradizionale[25]. All'ECO – mammografia andrebbe sempre aggiunta una valutazione ultrasonografica dei linfonodi loco – regionali. La diagnosi di certezza è ottenuta mediante esame istologico su Core biopsy e consta della successiva caratterizzazione della lesione mediante:

- Istotipo, grading e profilo molecolare valutato mediante IHC: HR, PgR, HER2, Ki – 67. Qualora HER2 desse un risultato equivoco (2+) l'ibridazione in situ (FISH) rappresenterebbe l'opzione migliore per chiarire l'eventuale positività.

- Nei soggetti HR +, PgR+ , HER2 -, N0 – N1 sono raccomandate la valutazione delle “firme genomiche”, per individuare score specifici, come il Recurrence Score, mediante OncotypeDX®.
- È raccomandato suddividere le singole neoplasie in sottogruppi molecolari: Luminal A, Luminal B, Triple – negative, Basal – like.
- In tutte le pazienti in cui la positività per mutazioni sulla linea germinale potrebbero determinare una variazione dell’iter terapeutico dovrebbero essere sottoposte a valutazione mediante test.

L'utilizzo della RMN presenta indicazioni precise:

- Positività a livello familiare per mutazioni sui geni BRCA1/2 e/o altre varianti patogenetiche (PVs).
- Cancro lobulare, meno comune rispetto al cancro duttale e sottostimato dalla mammografia e dall’ecografia[6], specialmente se accompagnato da bilateralità o multifocalità.
- Sospetto di multifocalità o multicentricità.
- Discrepanza fra clinica e reperti strumentali.
- Seno operato con protesi mammaria.
- Positività linfonodale con tumore primitivo occulto (CUP Syndrome).
- La RMN può essere utilizzata anche in caso fosse necessario differenziare lesioni pericicatriziali e nel valutare la risposta a terapia neoadiuvante.

Una volta performata la diagnosi è necessario stadiare la neoplasia mediante ulteriori esami diagnostico – strumentali. Secondo le linee guida AIOM ed ESMO risulta:

- Possibile omettere una stadiazione sistemica in pazienti con tumori in stadio iniziale (Stadio I – II secondo AJCC 2017) e favorire una stadiazione locoregionale, sempre valutando la possibilità di evidenze cliniche che, anche per tumori così limitati, possano far pensare a localizzazioni sistemiche di malattia.
- Esecuzione di TC del torace e ECO/TC addome, nonché di una scintigrafia ossea nei pazienti con più alto rischio metastatico alla diagnosi (in caso di linfonodi positivi, tumori con diametro > 5 cm, biologia aggressiva), similmente se il paziente presenta segni clinici di metastasi.
- TC/PET con FDG indicata solo se la stadiazione con TC, ecografia e scintigrafia risultasse inconclusiva.

- Prima di somministrare eventuale terapia adiuvante o chirurgia è necessaria la valutazione di emocromo, funzionalità epatica, fosfatasi alcalina, renale, calcio, stato menopausale.

La classificazione della neoplasia mammaria avviene usualmente mediante l'utilizzo del Sistema TNM (Tumor – Nodes – Metastasis), così come consultabile, presso il sito web dell'Istituto Superiore di Sanità: https://www.iss.it/documents/20126/8403839/LG_C0013_AIOM_Ca-mammario-precoce.pdf/fb5df1bd-2712-9166-68e7-6e296912776e?t=1704702928747, recentemente aggiornata dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC 8a edizione).

Tabella 3. Classificazione in stadi del carcinoma mammario - AJCC 2017 (8a edizione), così come riportato dalle linee guida AIOM – Carcinoma Mammario in stadio precoce, 2023[6]:

Stadio 0	Tis	N0	M0
Stadio IA	T1*	N0	M0
Stadio IB	T0 T1*	N1 mi N1 mi	M0
Stadio IIA	T0 T1* T2	N1** N1** N0	M0
Stadio IIB	T2 T3	N1 N0	M0
Stadio IIIA	T0 T1* T2 T3 T3	N2 N2 N2 N1 N2	M0
Stadio IIIB	T4 T4 T4	N0 N1 N2	M0
Stadio IIIC	Ogni T	N3	M0
Stadio IV	Ogni T	Ogni N	M1

*T1 include T1mic.

** I tumori T0 e T1 con sole micrometastasi linfonodali sono esclusi dallo stadio IIA e classificati come stadio IB.

- M0 comprende M0(i+).
- La designazione pM0 non è valida; qualsiasi M0 dovrebbe essere clinica.
- Se una paziente si presenta con M1 prima di una terapia sistemica neoadiuvante, lo stadio è considerato IV e rimane IV indipendentemente dalla risposta alla terapia neoadiuvante.
- La designazione di stadio può cambiare se esami diagnostici per immagine rivelano la presenza di metastasi a distanza, a condizione che siano stati eseguiti entro quattro mesi dalla diagnosi in assenza di progressione di malattia e che la paziente non abbia ricevuto terapia neoadiuvante.
- I prefissi “yc” ed “yp” applicati alla classificazione T e alla classificazione N indicano la stadiazione dopo terapia neoadiuvante. Nessun gruppo di stadio è assegnato nel caso di ottenimento di una risposta completa patologica (ad es. ypT0 ypN0 cM0).

Vale la pena ricordare una ulteriore classificazione, la Prognostic Stage Group, che unisce alla classificazione TNM, l'istotipo tumorale, l'assetto molecolare del tumore e nel caso dei tumori HR +, PgR +, HER2-, N0 – N1, l'utilizzo delle firme genetiche. Il NIH suddivide questo score in clinico e patologico, a seconda che venga definito prima o dopo un primo trattamento della neoplasia[26]. La classificazione basata sul Prognostic Stage Group è consultabile presso il sito web dell'Istituto Superiore di Sanità: https://www.iss.it/documents/20126/8403839/LG_C0013_AIOM_Ca-mammario-precocce.pdf/fb5df1bd-2712-9166-68e7-6e296912776e?t=1704702928747 o presso il sito web del National Cancer Institute: <https://www.cancer.gov/types/breast/stages - how-breast-cancer-stage-is-determined>.

A questa classificazione si sommano altri fattori prognostici importanti. I fattori prognostici rappresentano caratteristiche del paziente o della neoplasia che influenzano la storia naturale, l'outcome e il trattamento[6][15]:

Suddivisibili in:

1. Categoria I, di comprovata importanza prognostica:
 - Dimensioni tumorali, benché non sia stato identificato un preciso cut – off che determini un netto peggioramento della prognosi, sappiamo che una dimensione tumorale (pT), superiore a 2 cm collima con una frequenza di metastasi linfonodali superiore al 40% e con una prognosi peggiore, data dalla diminuzione della speranza di sopravvivenza[15].
 - Stato linfonodale del cavo ascellare: Pazienti con positività linfonodale sviluppano recidive a 10 anni nel 70% dei casi, contro il 15 – 30% dei soggetti con linfonodi negativi[15]; micrometastasi nel linfonodo sentinella o cluster isolati di cellule tumorali non impattano sulla prognosi [6].
 - Grading: neoplasie con grading G3 hanno prognosi peggiore[6][15].
 - Istotipo: Definire un'applicazione clinica diretta dell'istologia del tumore sulla prognosi è difficile, ma possiamo affermare che la diagnosi dei carcinomi lobulari è sottostimata dalle classiche metodiche (ECO – mammografia), presenta patterns di metastatizzazione retroperitoneale o su superfici sierose tipico e la variante pleomorfica ha prognosi fortemente infausta[15]. Altri tumori, come l'infiammatorio o il midollare hanno prognosi infausta, mentre il mucinoso e il tubulare, nettamente migliore[15].
 - Profilo molecolare dei recettori: la positività dei recettori estro – progestinici rappresenta un fattore prognositico positivo[15], data l'ormono – responsività delle neoplasie, secondo le linee guida ASCO e AIOM tutti i tumori in cui a livello IHC abbiamo una positività > 1% per HR e PgR, vengono considerati rispettivamente estrogeno e progestinico – positivo.

2. Categoria II, fattori prognostici non validati formalmente:

- Ki – 67: l'utilizzo dell'anticorpo monoclonale MIB1 mette in evidenza la proteina Ki – 67, fortemente espressa durante le fasi attive del ciclo cellulare, un suo valore inferiore al 5% collima con una prognosi migliore, per una minor attività proliferativa del tessuto, mentre un valore superiore al 30% con una prognosi peggiore [5][16][26].

1.1.6. Trattamento e follow – up del cancro mammario in situ:

I carcinomi in situ della mammella, principalmente DCIS (Ductal Carcinoma in Situ), rappresentano circa il 25% sul totale delle diagnosi di carcinoma del seno. Attualmente, così come prospettato dalle linee guida AIOM ed ESMO, i carcinomi in situ debbono essere trattati con chirurgia conservativa ed eventuale RT post – chirurgica, che appare necessaria in tutti quei casi di DCIS con grading intermedio/alto (G2 – G3), quest'ultimo è un fattore di rischio importante per lo sviluppo di un successivo carcinoma invasivo[6][27]. La mastectomia è applicata laddove il DCIS è molto esteso, il gesto chirurgico è R1, si hanno controindicazione alla RT, DCIS con sanguinamento dal capezzolo (normalmente la mastectomia è nipple – sparing), DCIS micropapillare o su richiesta della paziente[6]. Le attuali linee guida raccomandano:

- Un margine indenne da malattia di almeno 2 mm[6].
- La valutazione del linfonodo sentinella è indicata in caso forte sospetto di micro – invasione o in caso di lesioni estese (multifocali e/o microcalcificazioni)[6].
- La RT ha progressivamente assunto un ruolo centrale nella sterilizzazione della mammella, in particolare in relazione alla presenza di margini chirurgici positivi. Come mostrato da *Meena S. Moran et al* in un articolo pubblicato sul Journal of American Medicine Oncology, i pazienti sottoposti a RT post – chirurgica aventi margini positivi alla resezione hanno una sopravvivenza migliore a 5, 10 e 15 anni e il rischio di recidiva ipsilaterale è nettamente minore (HR: 0.73)[28]. Uno studio pubblicato su Lancet da *Boon H. Chua et al* ha mostrato come in soggetti con DCSI non a basso rischio, trattati con chirurgia conservativa (margini indenni di almeno 1 mm) e successiva RT dell'intera mammella (frazionata), ottengano un outcome migliore in termini di sopravvivenza libera da recidiva (5 anni), rispetto a chi non ha ricevuto tale boost post RT[29].
- Alla luce delle attuali conoscenze la terapia adiuvante con Tamoxifene nelle donne trattate con chirurgia e RT non è indicato, ma possibile, poiché riduce significativamente il rischio di recidiva locale[6]. Un trial randomizzato multicentrico ha messo in evidenza un numero di recidive nettamente superiore in pazienti trattate con placebo rispetto al gruppo a cui è stato

somministrato Tamoxifene (23.9 vs 11.6 eventi ogni 1000 persone/anno, HR: 0.48), similmente il Tamoxifene ha diminuito la comparsa di recidiva controlaterale con un HR:0.25[30]. Il follow – up è consigliato per un lungo periodo, almeno 10 anni, dato il numero di recidive[6].

Vanno altresì considerate fra le “lesioni neoplastiche in situ”:

- T1mi, rappresenta l’1% di tutti i carcinomi della mammella, le linee guida attuali indirizzano il management della lesione similmente al DCSI, con chirurgia primaria, possibile trattamento RT, possibile ET se i linfonodi ascellari sono positivi[6].
- LCIS: il carcinoma lobulare in situ emerge dalle cellule dell’unità duttulo/lobulare terminale. Fra le forme che destano dubbio vi è l’LCIS nella sua variante pleomorfa. Attualmente l’indirizzo è quello di trattare il PLCIS viene trattato in maniera simile al DCIS[6].

1.1.7. Trattamento e follow – up del cancro mammario in stadio precoce:

Il carcinoma della mammella in stadio precoce (Stadio I – II) presenta indicazione a trattamento chirurgico conservativo seguito da radioterapia sul parenchima residuo nelle linee guida delle principali società scientifiche, fra cui AIOM ed ESMO[6][27], poiché hanno mostrato una non inferiorità rispetto alla mastectomia radicale. La chirurgia è indicata con margini negativi per neoplasia[6][27]. La attuali linee guida AIOM consigliano di:

- Effettuare chirurgia con dissezione ascellare e RT in caso di rara CUP – Syndrome (attualmente dati controversi)[6].
- Approcciarsi in maniera comparabile ai carcinomi lobulari infiltranti[6].

Attualmente è raccomandata, la biopsia del linfonodo sentinella, così da stadiare efficacemente il cavo ascellare, evitando il rischio di over – treatment con dissezione del cavo ascellare[6].

Le indicazioni al trattamento radioterapico prevedono:

- Il trattamento con RT post – chirurgia è fortemente raccomandato in tutte le pazienti che hanno effettuato chirurgia conservativa, poiché riduce il rischio di recidiva locale e la mortalità[6][27].
- Irradiazione del cavo ascellare in pazienti con stadio pT3 – 4 e N $\geq$ 4 o in pazienti con N(+) qualsiasi, ma forte aggressività del tumore.
- Una metanalisi pubblicata sul The Lancet[31] ha messo in evidenza che:

1. La RT post – chirurgia conservativa riduce il rischio assoluto di recidiva a 10 anni (locale o a distanza) del 15,7% (IC: 13,7% - 17,7%, $p < 0,00001$)[31].
2. Similmente, riduce la mortalità a 15 anni del 3,8% (IC: 1,6% – 6%, $2p = 0,00005$).
3. Il beneficio maggiore lo ottengono le pazienti con N+ (riduzione del rischio assoluto di recidiva a 10 anni del 21,2% e riduzione della mortalità a 15 anni dell'8,5%)[31].

In tutte le pazienti con margini positivi (R1), dopo re – intervento va elargita una dose supplementare sul letto tumorale[6]. La RT va effettuata su tutta la mammella residua[6]. Un'ulteriore dose boost rispetto al regime standard si è dimostrata efficace nel ridurre il rischio di recidiva locale[32]. La RT dovrebbe essere somministrata nel più breve tempo possibile, entro le 6 – 8 settimane dalla chirurgia, in caso di CHT adiuvante, entro le 4 – 6 settimane dal termine della terapia[6].

La terapia sistemica adiuvante viene proposta alla paziente in relazione a fattori prognostici (rischio di ripresa di malattia), fattori predittivi (HR, HER2, BRCA1/2), benefici attesi, comorbidità e in base al volere della paziente[6]. La durata della terapia ormonale adiuvante è di almeno 5 anni e tiene conto dello stato menopausale, del rischio di recidiva di ogni paziente e di eventuali controindicazioni ad uno specifico regime terapeutico[6]. L'estensione oltre i 5 anni del regime ormonoterapico può essere preso in considerazione nei singoli casi, dato che le recidive si verificano maggiormente dopo i primi 5 anni dalla diagnosi. In relazione alle scelte del clinico, congiuntamente alla paziente, il regime di ET viene solitamente protratto per ulteriori 5 anni, ottenendo benefici in termini di riduzione della mortalità e sopravvivenza libera da malattia/recidiva (la terapia deve essere effettuata per un totale di almeno 7/8 anni)[6]. Un'ulteriore farmaco, approvato in Italia che può essere affiancato all'ET è l'Abemaciclib, farmaco anti CDK4/6 che viene impiegato in soggetti (HR+/HER2-) con alto rischio di recidiva ($pN+ \geq 4$ o $pN < N2$, con copresenza di almeno uno dei due fattori seguenti: dimensione tumorale ≥ 5 cm o grading G3)[6].

La CHT andrebbe iniziata entro le 4 – 8 settimane dalla chirurgia, in polichemioterapia, poiché la monoterapia si è dimostrata inferiore in termini di DFS e OS. Nelle pazienti candidate a chemioterapia HER2+, si introduce nello schema terapeutico il Trastuzumab, anticorpo monoclonale anti – HER2 per 1 anno[6]. Il Trastuzumab viene iniziato in concomitanza con la CHT[6]. Il Pertuzumab in doppio blocco con il Trastuzumab può essere indicato congiuntamente alla CT nei soggetti ad alto rischio di recidiva (linfonodi ascellari positivi). Il doppio blocco ha mostrato un outcome migliore nei soggetti con linfonodi positivi[6]. Neratinib può essere usato in tutti i soggetti HER2+ che hanno già completato la terapia con Trastuzumab[6].

La terapia neoadiuvante presenta risultati di outcome comparabili o leggermente inferiori in termini di recidiva locale rispetto al trattamento adiuvante, ma permette di[6]:

- Indicata nelle forme di carcinoma mammario localmente avanzato al fine di ridurre l'impatto globale sul paziente, nelle forme ad alto rischio di recidiva, nel carcinoma infiammatorio.
- Valutare la risposta individuale alla terapia e formulare una prognosi più accurata.
- Regolare la terapia adiuvante in base alla presenza di residuo di malattia, in soggetti senza pCR (ypT0 e ypN0).
- Olaparib +/- ET può essere aggiunto in terapia in tutti i soggetti HER2- ad alto rischio e BRCA1/2 mutati sulla linea germinale, trattati precedentemente con terapia neoadiuvante o aggiunto in terapia adiuvante.
- Nelle forme HER2+ è possibile attuare un doppio blocco Trastuzumab + Pertuzumab in aggiunta alla CHT. Si prosegue il doppio blocco anti – HERB2 in caso di risposta completa.
- Nei pazienti triplo negativo è possibile adottare uno schema CHT +/- Pertuzumab, con possibile proseguo in adiuvante post – operatorio.
- Nei pazienti HR+/HER2- è possibile attuare CHT neoadiuvante.

1.1.8. Trattamento e follow – up del cancro mammario in stadio avanzato:

Nel trattamento del cancro avanzato del seno le opzioni terapeutiche sono le seguenti[36]:

- Inibitori della CDK4/6 ed ET (nei pazienti HR + e HER2 -). Attualmente tutti e tre gli inibitori della CDK4/6 (Palbociclib, Ribociclib ed Abemaciclib) hanno mostrato simile efficacia in termini di risposta clinica, controllo della malattia e sopravvivenza libera da progressione, nonché l'impatto sulla qualità di vita del paziente. Nei pazienti con mutazione germinale di BRCA1/2 è possibile utilizzare anche un inibitore di PARP, Talazoparib, rimborsato dal SSN.
- Nei pazienti HER2 + si procede in prima linea con un'associazione in doppio blocco Trastuzumab/Pertuzumab, associata a taxano. La seconda linea è generalmente rappresentata da Trastuzumab – Deruxtecan, anticorpo farmaco – coniugato. In alternativa sono disponibili anti – HER2 – TDM1, anch'esso anticorpo farmaco – coniugato (Trastuzumab – Deruxtecan è risultato maggiormente raccomandato rispetto a Trastuzumab – TDM1) o Trastuzumab + capecitabina + Tucatinib.
- Nei pazienti con tumore triplo negativo, PDL1 – positivi è raccomandata CHT associata ad immunoterapia, opzioni possibili sono Atezolizumab e Pembrolizumab. Nei pazienti con BRCA1/2 – mutati e PDL1 – negativi andrebbe offerta una terapia con inibitore di PARP. In soggetti triplo – negativi, PDL1 – 1 negativi e BRCA1/2 – negativi, la CHT rimane ancora il

trattamento di scelta. Nei pazienti con carcinoma non resecabile, localmente avanzato, con almeno due terapie sistemiche ricevute è possibile utilizzare il Sacituzumab, anti – TROP2.

- Nei pazienti HER2 – low trattati con 1 o 2 linee CHT e almeno una linea di ET (se HR+) o recidivanti a 6 mesi dal termine della chemioterapia, è approvato l’uso di Trastuzumab – Deruxtecan.

1.1.9. Screening del cancro mammario:

Lo screening del cancro al seno in Italia prevede l’esecuzione di una mammografia ogni 2 anni nelle donne con età compresa tra i 50 e i 69 anni. Le raccomandazioni secondo le Linee guida ECIBC prevedono l’esecuzione di[6]:

- Mammografia ogni 2 – 3 anni in soggetti di età compresa fra 45 e 49 anni.
- Mammografia ogni 2 anni in soggetti di età compresa fra 50 e 69 anni.
- Mammografia ogni 3 anni in soggetti di età compresa fra 70 e 74 anni.

In alcune regioni lo screening viene effettuato fino all’età di 74 anni ed è stata adottata l’estensione dello screening a donne tra 45 e 49 anni con mammografia annuale. Nelle donne con alto rischio per importante storia familiare di carcinoma mammario o portatrici di mutazione dei geni BRCA1/2, i controlli strumentali vengono da pratica clinica iniziati all’età di 25 anni o 10 anni prima dell’età di insorgenza del tumore nel familiare più giovane[6].

1.2. CANCRO DELL’OVAIO

1.2.1. Epidemiologia del cancro ovarico:

L’American Cancer Society ha stimato, per l’anno 2026, circa 21’010 nuovi casi di cancro ovarico, con un numero di morti stimato in 12’450[1]. Dati che rendono conto di una neoplasia nettamente meno comune rispetto al cancro mammario, di cui l’ACS ha stimato 324.580 nuovi casi nel 2026, rappresentando, stima del 2022 prospettata dall’OMS mediante il GCO (Global Cancer Observatory) l’11,5% delle neoplasie. Il cancro ovarico è stato stimato come l’0,89% del totale dei nuovi casi di tumore negli Stati Uniti d’America[2]. I dati presentati per l’anno 2025 in Italia utilizzando i database disponibili nei registri AIRTUM stimano[3]:

- l’incidenza di nuovi casi di tumore pari a 362.100, di cui 179.800 nelle donne e 182.300 negli uomini.
- Il cancro ovarico è stimato in 5330 casi (ASR = 14.7), con un’incidenza pari al 3% del totale dei tumori femminili e dell’1,5% dei nuovi casi di neoplasia in assoluto. Dati comparabili sono stati prospettati dallo European Cancer Information System (ECIS)[4].

1.2.3. Biologia molecolare e fattori di rischio e protettivi del cancro ovarico:

Il cancro ovarico viene suddiviso in relazione a specifici profili molecolari in 5 gruppi principali di patologia[34][35]:

- Carcinoma sieroso di alto grado (70%): positività per mutazioni di p53, WT1, p16, BRCA1, HR e talvolta PgR.
- Carcinoma endometrioide (10%), mutazioni principali riguardanti HNPCC (instabilità dei microsatelliti), CTNNB1 (β – catenina), ARID1A, PTEN, KRAS.
- Carcinoma a cellule chiare (10%), mutazioni principali riguardanti PTEN, PI3KCA, ARID1A.
- Carcinoma mucinoso (10%), mutazioni di KRAS e ERBB2.
- Carcinoma sieroso di basso grado (< 5%), mutazioni di KRAS e BRAF.

Queste 5 entità patologiche presentano profili molecolari/immunoistochimici differenti, che collimano con alterazioni genetiche differenti, aggressività, prognosi e fattori di rischio differenti[34]. Il carcinoma sieroso di alto grado può presentare mutazioni germline e/o somatiche di BRCA1/2, con aumento dell'incidenza di cancro ovarico dal 30% al 70%[34] (life time risk – ESMO, Annals of Oncology: 15% – 30% per BRCA2 e 40 – 60% per BRCA1[36][52]. Il carcinoma sieroso di basso grado, caratterizzato da prognosi migliore e tasso proliferativo minore rispetto all'alto grado[35], presenta mutazioni di BRAF e KRAS[34][35]. Il tumore mucinoso presenta mutazioni di KRAS nel 43.6% dei casi. I carcinomi mucinosi hanno prognosi eccellente quando limitati all'ovaio, sono scarsamente responsivi alla CT[34]. I carcinomi endometrioidi dell'ovaio hanno un outcome generalmente favorevole, associati a focolai di endometriosi adiacenti alla neoplasia. Le neoplasie a CC hanno una prognosi intermedia[34][35].

Tabella 1. Riassuntiva delle principali caratteristiche molecolari del cancro epiteliale dell'ovaio - Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up (ESMO)[37]:

		HGSC	EC	CCC	LGSC	MC
IHC staining	p53	Abnormal	Abnormal/normal	Normal	Normal	Normal
	p16	+	–	–	–	–
	WT-1	+	–	–	+	–
	ER	+/-	+	–	+	–
	PAX8	+	+	–	+	–
	Vimentin		+			
	HNF1 β CDX2			+		+
Molecular alterations (decreasing prevalence from top to bottom)		<i>TP53</i> <i>BRCA1/2</i> HRD	<i>CTNNB1</i> <i>ARID1A</i> <i>PTEN</i> <i>KRAS</i> <i>TP53</i> (high-grade EC) MSI/dMMR	<i>ARID1A</i> <i>PI3KCA</i> <i>PTEN</i> MSI/dMMR	<i>KRAS</i> <i>BRAF</i> <i>RAF</i>	<i>CDKN2A</i> <i>KRAS</i> <i>HER2</i>

CCC, clear-cell carcinoma; CDX2, homeobox protein CDX-2; dMMR, mismatch repair deficiency; EC, endometrioid carcinoma; EOC, epithelial ovarian cancer; ER, estrogen receptor; HGSC, high-grade serous carcinoma; HNF1 β , hepatocyte nuclear factor-1 β ; HRD, homologous recombination deficiency; IHC, immunohistochemistry; LGSC, low-grade serous carcinoma; MC, mucinous carcinoma; MSI, microsatellite instability; PAX8, paired box gene 8; WT-1, Wilms tumour 1.

Fra i fattori di rischio e i fattori protettivi vanno menzionati[34][15]:

- Mestruazione retrograda: la presenza di forti quantità di ferro derivanti dalla lisi eritrocitaria favorirebbe, nell'ambiente a basso tenore d'ossigeno la formazione di ROS, con rotture del DNA, perossidazione lipidica, attivazione degli oncogeni e inibizione degli oncosoppressori. I tumori HGSC sembrerebbero derivare proprio da cellule di origine tubarica (STIC).
- La terapia contraccettiva orale presenta un effetto protettivo, similmente al cancro endometriale, che, se protratta per diversi anni presenta una coda di protezione anche fino a 20 anni dopo la cessazione.
- La Terapia Ormonale Sostitutiva (TOS) rappresenterebbe un fattore di rischio per l'insorgenza del cancro ovarico, sebbene i dati siano attualmente abbastanza discordi.
- Fattori dietetici: dieta ricca di grassi saturi ed alcol predispone maggiormente al cancro ovarico, di contro l'assunzione di vitamina C, grassi insaturi e l'attività fisica moderata sono protettivi.
- Le terapie ormonali attuate durante le tecniche di PMA, necessarie per indurre l'ovulazione e permettere il prelievo degli ovuli, facilitando l'ovulazione incessante determinerebbero microtraumi nei quali incorrerebbe l'epitelio celomatico, predisponendo all'insorgenza della neoplasia.
- Menarca tardivo, menopausa precoce, multiparità e allattamento al seno sarebbero fattori protettivi proprio in relazione alla diminuzione dei cicli ovulatori.
- Come sopra specificato le mutazioni di BRCA1/2 sulla linea germinale rappresentino un fattori di rischio per l'insorgenza del cancro ovarico, uno studio condotto da *Kathryn Alsop et al* ha messo in luce in una coorte di 1001 pazienti affette da carcinoma ovarico non mucinoso, una prevalenza di mutazioni BRCA1/2 sulla linea germinale del 14.1%, con una netta prevalenza del sieroso sulle altre varianti, BRCA1 è risultato maggiormente mutato rispetto a BRCA2 (62.4%)[37]. Similmente è stata correlata la presenza di mutazioni di BRCA1 con l'età dei soggetti, con un'età media di 53.4 anni, contro i 60.5 anni di media delle pazienti che non presentano mutazioni sulla linea germinale. Il 51.5% dei soggetti con BRCA1/2 mutato sulla linea germinale aveva già avuto una diagnosi di cancro mammario e il 54% delle pazienti positive per mutazioni sulla linea germinale avevano familiarità materna per cancro al seno prima dei 50 anni[37]. Va anche considerata la presenza di genotipi cosiddetti "BRCAness", in cui mutazioni di RAD51, FANC, ATM, ATR, PALB2, BARD e BRIP definiscono un fenotipo tumorale simile ad HGSC correlato a mutazioni dei BRCA, con buona risposta ai regimi chemioterapici con platino, PARP inibitori e con prognosi migliore.

1.2.4. Diagnosi, stadiazione e prognosi del cancro ovarico:

Attualmente non esiste uno screening ufficiale ed efficace consigliato dalle principali linee guida internazionali e questo pone le basi per la bassa sopravvivenza di pazienti affette da cancro ovarico[34][37]. Il cancro dell'ovaio viene diagnosticato nella maggior parte dei casi in stadio avanzato, con sintomi spesso severi: gonfiore e massa addominale, dolore addominale, diarrea, costipazione, sanguinamenti vaginali, nausea, calo ponderale, dispepsia, sazietà e infine sintomi respiratori e versamento pleurico[37]. In una situazione del genere occorre procedere mediante[15][37]:

- Accurata anamnesi ed esame obiettivo.
- Dosaggio dei marker sierici: CA - 125, elevato nell'85% dei pazienti con malattia avanzata, ma solo nel 50% dei soggetti con malattia in Stadio I secondo le stime FIGO[37]. Andrebbero affiancati il CEA e il CA - 19.9 al fine di distinguerlo da metastasi GI. In ultimo, andrebbe dosato l'HE4, rivelatosi promettente se correlato con il CA - 125[15].
- La diagnosi strumentale, così come suggerito dalle più recenti linee guida ESMO (2023), nonché da linee guida pubblicate da *J.E. Dodge et al, 2012* dovrebbe primariamente basarsi sull'ecografia transvaginale/transaddominale degli annessi[15][37][40], l'ecografia e l'eco Color doppler/eco - Power doppler della massa sono in grado di fornirci informazioni molto utili per identificare la massa ed eventuale estensione di malattia (nodularità ipoecogene del peritoneo, retrazione e inglobamento dei tessuti pelvici, carcinosi della radice dei meseri, *omental - cake*)[15][40]. Qualora l'ECOGRAFIA non fosse sufficiente è consigliata la RM con mdc. Ulteriore indagine consigliata a fini stadiativi e di planning chirurgico è la TC del torace, dell'addome e della pelvi. Per completare la diagnosi è necessaria una valutazione istologica da biopsia o preferibilmente da pezzo chirurgico; in ultimo sono necessari una valutazione citologica del liquido peritoneale e pleurico per completare la stadiazione[15][37][40]. Uno strumento ulteriormente utilizzabile per la stadiazione e la valutazione della reale estensione di neoplasia, nonché per il trattamento chirurgico è la laparoscopia (LPS)[15][40].

La prognosi del cancro dell'ovaio è definita da diversi fattori, fra i quali:

- Stadio.
- Grado di differenziazione.
- Sottostadio.
- Età della paziente.
- Tipo istologico:

1. I carcinomi sierosi vengono di norma diagnosticati più tardivamente e sono masse ovariche spesso bilaterali, l'HGSC ha una prognosi molto scarsa, il tumore di basso grado ha una prognosi buona[15].
2. I carcinomi mucinosi hanno un epitelio simil – intestinale, possono raggiungere dimensioni notevoli, solo il 20% è bilaterale e solo il 5% fuoriesce dall'ovaio al momento della diagnosi, hanno prognosi buona[15].
3. I carcinomi endometrioidi si associano ad endometriosi nella paziente giovane e presentano prognosi migliore dei mucinosi e dei sierosi[15].
4. I carcinomi a cellule chiare si presentano come lesioni francamente invasive, con prognosi peggiore rispetto alle altre forme di cancro ovarico. Sono bilaterali nel 12% dei casi[15].

In relazione a quanto detto è possibile suddividere la prognosi in[34]:

Tabella 2. Tabella riassuntiva prognosi del carcinoma ovarico - AIOM Linee guida 2021 carcinoma dell'ovaio:

Prognosi buona					Prognosi intermedia					Prognosi scarsa				
(sopravvivenza > 90% a 5 aa)					(sopravvivenza > 70% a 5 aa)					(sopravvivenza = 45% a 5 aa)				
Stadio IA – IB, G1 (ben differenziato)					Stadio IA – IB, G2 (moderatamente differenziato)					Stadio IA – IB, G3 (scarsamente differenziato)				
					Stadio IC, G1					Stadio IC, G2, G3				
										Stadio II				

Fattori associati a prognosi sfavorevole sono negli stadi avanzati di malattia:

- L'istotipo mucinoso o a cellule chiare (minore chemiosensibilità).
- Residuo di malattia dopo chirurgia primaria.
- Stato dei geni BRCA.

1.2.5. Stadiazione del cancro dell'ovaio:

La stadiazione definitiva del cancro ovarico avviene mediante laparoscopia o laparotomia operativa, in relazione alla corretta necessità di stadiazione anatomo - patologica della malattia, secondo le linee guida FIGO[34][37]. Le indagini strumentali effettuate in precedenza sono indicative della possibilità di una chirurgia citoriduttrice di successo[37] e della fattibilità della stadiazione mediante approccio laparoscopico o laparotomico; in tal senso, l'assenza di controindicazioni medico – chirurgiche e la candidabilità della malattia alla citoriduzione, indicano di procedere con l'approccio diagnostico – chirurgico combinato[37].

Tabella 3. Stadiazione FIGO del carcinoma dell'ovaio 2014 – AIOM Linee guida 2021 carcinoma dell'ovaio:

Stadio I (tumore limitato alle ovaie o alle tube).	IA:
	• Tumore limitato a un ovaio (capsula intatta) o alla superficie di una tuba; • Assenza di tumore sulla superficie dell'ovaio o della tuba; • Assenza di cellule maligne nel liquido ascitico o nel lavaggio peritoneale.
	IB:
	• Tumore limitato a entrambe le ovaie (capsula intatta) o tube; • Assenza di tumore sulla superficie dell'ovaio o della tuba assenza di cellule maligne nel liquido ascitico o nel lavaggio peritoneale.
	IC - Tumore limitato a una o entrambe le ovaie o tube, con una delle seguenti caratteristiche: IC1: Spilling intraoperatorio; IC2: Capsula rotta prima dell'intervento chirurgico o tumore presente sulla superficie dell'ovaio o della tuba; IC3: Cellule maligne nel liquido ascitico o nel lavaggio peritoneale.
Stadio II (Tumore che coinvolge una o entrambe le ovaie o tube con estensione pelvica o tumore peritoneale primario).	IIA Estensione e/o impianti nell'utero e/o nelle tube e/o nelle ovaie
	IIB Estensione ad altri tessuti pelvici intra – peritoneali.
Stadio III (Tumore che coinvolge una o entrambe le ovaie o tube o tumore peritoneale primario, con diffusione confermata citologicamente o istologicamente al peritoneo al di fuori della pelvi e/o metastasi ai linfonodi retroperitoneali).	• IIIA1= Solo linfonodi retroperitoneali positivi (con documentazione citologica o istologica); • IIIA1= Metastasi con diametro maggiore fino a 10 mm; • IIIA1 = Metastasi con diametro maggiore superiore a 10 mm; • IIIA2= Interessamento peritoneale extra-pelvico microscopico con o senza linfonodi retroperitoneali positivi.
	• IIIB = Metastasi peritoneali extra-pelviche macroscopiche fino a 2 cm di diametro massimo con o senza linfonodi retroperitoneali positivi.
	• IIIC: Metastasi peritoneali extra-pelviche macroscopiche di diametro massimo superiore a 2 cm con o senza linfonodi retroperitoneali positivi.
Stadio IV (Metastasi a distanza escluse le metastasi peritoneali).	• IVA = versamento pleurico con citologia positiva
	• IVB = metastasi parenchimali e/o metastasi a organi extra-addominali (inclusi i linfonodi inguinali e i linfonodi al di fuori della cavità addominale).

1.2.6. Trattamento e follow – up del cancro ovarico:

Il trattamento chirurgico è il trattamento di scelta nella neoplasia ovarica, con fini diagnostici, stadiativi e terapeutici. L'approccio laparotomico è la tecnica di scelta, sebbene in mani esperte, in uno stadio iniziale di malattia, anche l'approccio laparoscopico possa essere tentato. Quest'ultimo è indicato anche nei casi di malattia incerti a livello strumentale, in cui è necessario valutare l'effettiva citoriduttibilità[34][37]. La ristadiatione va effettuata quando il carcinoma è di riscontro accidentale. La citoriduzione è attuata sia nel cancro in stadio precoce, sia in quello in stadio avanzato con approcci leggermente diversi[34][37]. La citoriduzione ottimale, che collima con una prognosi migliore, non prevede la presenza di malattia macroscopicamente rilevabile[34]. I criteri sfavorevoli ad una chirurgia radical, ottimale sono: infiltrazione della radice mesenterica, carcinomatosi diffusa al piccolo intestino, infiltrazione dell'ilo epatico e multiple localizzazioni epatiche. La localizzazione extra – addominale è controindicazione alla chirurgia, se non in casi specifici[34]. Non c'è indicazione a linfadenectomia sistematica se non si hanno localizzazioni linfonodali valutati in pre - e in intraoperatoria, con resezione radicale[34]. La chemioterapia neoadiuvante (NCAT), seguita da chirurgia d'intervallo è raccomandata nelle pazienti in cui il gesto chirurgico primario non sia stato risolutivo, tale chirurgia d'intervallo non è da prendere in considerazione negli stadi III – IV se la resezione primaria è risolutiva e ottimale, senza malattia macroscopica residua[34]. La citoriduzione secondaria della malattia residua viene effettuata raramente, poiché le recidive (circa il 75 – 80%) delle pazienti recidiva, vengono trattate con chemioterapia[34]. Nelle recidive in cui è possibile ottenere l'assenza di residuo di malattia macroscopica è indicata la chirurgia citoriduttiva in aggiunta, dove indicata alla CT con platino[34].

La determinazione della terapia adiuvante negli stadi iniziali di malattia (Stadio I e IIA), viene effettuata in relazione a stadio, grading (fattori prognostici ben definiti), suddividendo le pazienti in tre categorie di rischio[34]:

Tabella 4. Riassunto indicazioni terapia medica di prima linea nel cancro ovarico, desunte dalle linee guida AIOM[34]:

Rischio basso	Stadio IA – IB G1	Chirurgia risolutiva nel 95% dei casi
Rischio intermedio	Stadio IA – IB G2 e IC G1	CT adiuvante possibile
Rischio alto	Stadio IA – IB G3, IG G2 – G3, II	CT adiuvante consigliata

Una letteratura più recente tende, basata sulle evidenze, a tenere conto delle differenze biologiche delle diverse istologie del tumore ovarico[34].

Negli stadi avanzati di cancro ovarico (FIGO – Stadio IIB – IV) lo standard terapeutico prevede CHT con Carboplatino + Paclitaxel. Una valida alternativa è la combinazione Carboplatino – PLD. Va ricordato che nel tumore in stadio avanzato può essere presa in considerazione la terapia intraperitoneale in pazienti ben selezionate.

Terapia di mantenimento:

- La terapia di combinazione carboplatino/paclitaxel associato a bevacizumab e successivo mantenimento con bevacizumab (Nelle pazienti con stadio FIGO IIB e IV) può essere presa in considerazione; in particolare, l'aggiunta del BEV andrebbe effettuata in tutte quelle pazienti con citoriduzione non ottimale.
- Nelle pazienti con carcinoma sieroso di basso grado (FIGO Stadio II – IV) può, in caso di positività dei recettori, essere presa in considerazione l'ET di mantenimento post – CT.
- L'aggiunta in mantenimento di Olaparib dovrebbe essere presa in considerazione nelle pazienti con BRCA – mutato (germinale o somatico), tumore sieroso o endometrioidale, in uno stadio compreso fra III e IV, sia con risposta completa, sia parziale alla CT di prima linea.
- Similmente l'aggiunta di Niraparib o Rucaparib andrebbe presa in considerazione in caso di tumore sieroso o endometrioidale, in uno stadio FIGO compreso fra III e IV, sia con risposta completa, sia parziale alla CT di prima linea. L'utilizzo di PARP-inibitori risulta particolarmente efficace nelle pazienti HRD-positive, meno in quelle HRD-negative.

Terapia delle recidive

La CT di seconda linea (il tasso di recidive resta elevato anche dopo I linea chemioterapica) viene valutata in relazione alla PFI (Platinum Free Interval), in generale considerando un cut – off di 6 mesi: pazienti con recidiva entro 6 mesi o progressione durante la I linea, con ipersensibilità al platino o controindicazioni non sono rieleggibili per un trattamento in II linea con platino. Altri fattori nella scelta tengono in considerazione comorbidità, stato del BRCA, tossicità residue ed innumerevoli altri fattori. DLP, Topotecano, Gemcitabina, Paclitaxel, Etoposide, Vinorelbina e Ciclofosfamide orale sono i farmaci maggiormente indicati (laddove possibile, nei soggetti eleggibili per ritrattamento con platino si introduce in combinazione con paclitaxel, gemcitabina o PDL). PARPi e Bevacizumab

possono essere presi in considerazione come terapia aggiuntiva e di mantenimento. La polichemioterapia si è dimostrata non superiore rispetto alla monochemioterapia[34].

I protocolli di follow – up non sono attualmente standardizzati, ma richiedono un approccio personalizzato:

1. Visite ginecologiche periodiche con EO.
2. L'ACR (American College of Radiology) ha identificato la TC come esame di scelta per il FU, con la possibilità di sostituirla con ECO – TV periodiche. Ecografie periodiche andrebbero comunque eseguite in pazienti che hanno ricevuto chirurgia fertility sparing. La PET/TC può essere usata per appropriatezza al pari della TC.
3. Dosaggio periodico del CA – 125, molto utile, seppure la sola recidiva biochimica non permetta l'avvio di un regime chemioterapico.

In ultima analisi, vanno ricordati i BOT, tumori borderline epiteliali, cistici. Presentano un trattamento eminentemente chirurgico, con chirurgia fertility sparing nella donna giovane (< 40 anni), sempre tenendo conto dello staging operatorio e di una eventuale disseminazione al di fuori dell'ovaio. L'eventuale trattamento CT adiuvante, qualora fosse necessario, in relazione all'impianto extraovarico di neoplasia sarebbe *platinum – based*.

2. MUTAZIONI SULLA LINEA GERMINALE NELLA HBOC SYNDROME E NELLA SINDROME DI LYNCH:

2.1.1. Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome (HBOC Syndrome):

L'HBOC Syndrome o Sindrome del cancro ereditario del seno e dell'ovaio viene definita dal National Cancer Institute come *“An inherited disorder in which the risk of breast cancer (especially before the age of 50) and ovarian cancer is higher than normal. People with HBOC syndrome may also have an increased risk of other types of cancer, including pancreatic cancer, prostate cancer, and melanoma.”*. Il rischio di sviluppare neoplasia mammaria o ovarica e secondariamente pancreatica, prostatica o melanoma è correlato alla presenza di mutazioni sulla linea germinale rapportabili a determinati geni, di norma implicati nel riparo del DNA.

Fra i geni che presentano la maggior prevalenza di mutazione possiamo enumerare[50][51]:

- BRCA1 e BRCA2[50], presentano elevata prevalenza e penetranza[39] e come mostrato da Leila Dorling et al in un articolo pubblicato sul New England Journal of Medicine[51], l'*overall – risk* per l'insorgenza del cancro ereditario della mammella è nettamente aumentato (OR = 10.57 IC: 95% (8.02–13.93) per BRCA1 e OR = 5.85 IC:95% (4.85–7.06) per BRCA2.

- CHEK2[50], *over – all risk* aumentato (OR = 2.54 IC: 95% (2.21–2.91)).
- ATM[50], *over – all risk* aumentato (OR = 2.10 IC: 95% (1.71–2.57))[51].
- PALB2[50], *over – all risk* aumentato (OR = 5.02 IC: 95% (3.73–6.76))[51].

Tabella 1. Rischi associati alla presenza di varianti patogenetiche germinali dei geni BRCA1 e BRCA2 (AIOM – Linee guida 2025 – Sindromi di predisposizione ereditaria ai tumori):

Tipologia di tumore	Rischio assoluto VP BRCA1	Rischio assoluto VP BRCA2
Mammella femminile	>60%	>60%
Mammella maschile	0,2-1,2% all'età di 70 anni	1,8-7,1% all'età di 70 anni
Ovaio (epitelio di superficie) e tube	39-58%	13-29%
Pancreas	≤5%	5-10%
Prostata	7-26%	19-61%

Le varianti proteiche ipofunzionanti - troncate[51] di questi 5 geni presentano un rischio di sviluppo di neoplasia significativamente aumentato e sono le principali associate all'insorgenza del cancro ereditario della mammella. Altri geni associati allo sviluppo dell'HBOC sono stati identificati in RAD51C, RAD51D, BARD e p53[51].

Geni e rischio assoluto correlati all'insorgenza del tumore mammario, ovarico e di altre neoplasie secondo quanto riportato dalle linee guida AIOM 2025[39]:

Tabella 2. Sindromi di predisposizione ereditaria a tumori associate ad un aumentato rischio di tumore della mammella, dell'ovaio, del pancreas, della prostata e di altre neoplasie (rare) - (AIOM – Linee guida 2025 – Sindromi di predisposizione ereditaria ai tumori):

Gene	Rischio assoluto di tumore della mammella	Rischio assoluto di tumore dell'ovaio	Rischio assoluto di tumore del pancreas, della prostata e di altre neoplasie
ATM	20-30%	2-3%	Pancreas 5-10% Prostata evidenze emergenti
BARD1	17-30%	Nessuna evidenza	Evidenze non note o insufficienti
BRIP1	Dati insufficienti	5-15%	Evidenze non note o insufficienti
CDH1	41-60% (carcinoma lobulare)	Nessuna evidenza	Gastrico
CDKN2A	Nessuna evidenza	Nessuna evidenza	Pancreas >15% Melanoma 28-76%
CHEK2	20-40%	Nessuna evidenza	Prostata evidenze emergenti
MLH1, PMS2 MSH2, MSH6	<15%	MLH1 4-20% MSH2 8-38% MSH6 ≤1-13% PMS2 1,3%-3%	Pancreas <5-10% (escluso PMS2) Colon-retto e utero**
NF1	20-40%	Nessuna evidenza	Tumori maligni della guaina dei nervi periferici; GIST**
PALB2	41-60%	3-5%	Pancreas 2-5%
PTEN	40-60%	Nessuna evidenza	Tiroide, colon-retto, endometrio, rene**

RAD51C	17-30%	10-15%	Evidenze non note o insufficienti
RAD51D	17-30%	10-20%	Evidenze non note o insufficienti
STK11	32-54%	Nessuna evidenza	Pancreas >15% Ovaio non epiteliale >10%
TP53	>60%	Nessuna evidenza	Pancreas 5-10% Altre neoplasie

2.1.2. Basi molecolari della Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome:

Già dagli anni Ottanta e Novanta del secolo scorso è stata identificata la stretta relazione che lega le mutazioni di specifiche sequenze genetiche e la predisposizione all'insorgenza del cancro. Il cancro è in ultima analisi una malattia correlata ad alterazioni strutturali del genoma, progressivamente assunte dalla cellula, le quali determinano un deterioramento dei pathway molecolari che frenano la progressiva deriva verso la malignità. Sebbene si possa affermare, a livello somatico, questa diretta correlazione fra genetica ed insorgenza del cancro, se ci spostiamo ad analizzare le mutazioni insorte a livello germinale è indubbio che si debba parlare di “predisposizione” all'insorgenza di neoplasia. Mutazioni su di un singolo gene non possono causare direttamente il cancro (Kinzler e Vogelstein, 2004)[54], di fatto, lo sviluppo del cancro è un processo che si basa sull'accumulo di molteplici trasformazioni su geni differenti, solo in tal caso si ha la piena assunzione di malignità e spesso di invasività[54]. I geni correlati allo sviluppo del cancro inizialmente identificati vennero suddivisi in *gatekeeper* and *caretaker* (Kinzler e Vogelstein, 1998) e i principi di base della carcinogenesi identificati più di venti anni fa rimangono, ancora oggi, validi:

- **Geni gatekeeper:** questi geni, successivamente definiti oncosoppressori, codificano per proteine che bloccano la crescita cellulare e promuovono la morte programmata, fungendo da freno intracellulare alla proliferazione[55]. I geni gatekeeper sono generalmente molto specifici e diversi citotipi presentano pochi geni con questa funzione, RB, APC, VHL, NF1 sono alcuni esempi direttamente correlati all'insorgenza di specifiche neoplasie, quali il retinoblastoma, la FAP, la Sindrome di Von Hippel – Lindau o la Sindrome di Von Recklinghausen. I geni gatekeeper necessitano, in genere, di perdita dell'eterozigosi, in linea con la teoria del “doppio colpo” (Knudson, 1985)[54][55]; risulta cioè necessario, affinché l'attività di arresto del ciclo cellulare sia deficitaria, che entrambi gli alleli, materno e paterno,

risultino mutati. Soggetti che presentano una mutazione germinale su specifici oncosoppressori sono maggiormente predisposti all'insorgenza del cancro, poiché è probabilisticamente più verosimile che assumano una seconda alterazione sull'allele wilde – type a livello somatico. Soggetti che non presentano mutazione su queste specifiche particelle cromosomiche possono in ogni caso presentare mutazioni somatiche su entrambi gli alleli, ma confinati alla linea tumorale. Un tumore generalmente contiene dalle due alle otto mutazioni su geni “drivers” e l'insorgenza, proliferazione e diffusione dello stesso è correlato ad una deregolazione delle vie di sopravvivenza cellulare, di morte cellulare e di mantenimento della stabilità genomica [61]. Un ulteriore gene *gatekeeper* implicato in tutte e tre queste fondamentali vie cellulari è p53. La mutazione di un primo gene *gatekeeper*, conferisce un vantaggio proliferativo importante, ma è solo con l'assunzione di una seconda trasformazione, ad esempio su geni come KRAS (come avviene a livello del cancro colon – rettale), che il processo prosegue ulteriormente, determinando l'espansione clonale di una linea cellulare più avvantaggiata rispetto alle cellule non mutate circostanti. Questi milioni di cloni cellulari assumono ulteriori mutazioni, ad esempio a livello di PT53, progredendo verso la malignità. Le mutazioni in questione, cioè quelle che conferiscono vantaggio proliferativo sono definite “drivers”. Tutte quelle mutazioni definite “passangers” vengono invece assunte a livello somatico prima della trasformazione neoplastica e non determinano un vantaggio proliferativo[61].

- **Geni caretaker:** I geni caretaker codificano per proteine implicate nel mantenimento della stabilità genomica ed una loro alterazione può rapidamente far precipitare il processo di cancerogenesi. Se presupponiamo una mutazione *gatekeeper*, con vantaggio proliferativo del clone, la presenza di una sottostante, ad esempio germinale mutazione di un gene caretaker accelera il processo di cui sopra. È stato postulato che la mutazione germinale di un caretaker, trasmesso con dominanza, richiede tre ulteriori mutazioni: l'allele sano dello stesso gene e due geni *gatekeeper*[61]. Geni appartenenti a questa categoria sono MLH1, MSH2, MSH6, BRCA1, BRCA2.

La prevalenza di mutazioni germinali predisponenti a carico di donne con cancro al seno è attualmente stimata fra il 7% e il 10%[62]. In un'analisi basata sui dati del CARRIERS Consortium Study, che riunisce ben 17 studi differenti, dei quali 12 sono *population based* la prevalenza è stata stimata al 5% circa delle 32'247 pazienti malate di cancro al seno. La prevalenza nelle donne appartenenti alla categoria *case control* è stata dell'1,63%. Le principali mutazioni osservate sono state:

- BRCA2, con una prevalenza dell'1.29%; (95% CI, 1.18 to 1.42)[62].
- CHEK2, con una prevalenza dell'1.08%; (95% CI, 0.98 to 1.20)[62].
- BRCA1, con una prevalenza dell'0.85%; (95% CI, 0.76 to 0.96)[62].

Nello stesso studio la prevalenza delle VUS è stata del 18.9% (95% CI, 18.5 to 19.4) fra le pazienti malate e del 18.5% (95% CI, 18.1 to 19.0) fra i *controls cases*[62].

2.1.3. Patogenesi e rischio legato a BRCA1 e BRCA2 mutati:

La proteina BRCA1 è un potente oncosoppressore di 1863 residui amminoacidici codificato dal gene omonimo localizzato sul cromosoma 17. Presenta una struttura che dall'N – T al C – T è così articolata:

- Dominio RING (Really Interesting New Gene) di legame con la proteina BARD1 (BRCA1 Associated Ring Domain Protein 1). Il Dominio RING è strutturato da 3 β – foglietti e un' α – elica centrale, fiancheggiato da 2 α – eliche perpendicolari al Dominio stesso. Mediante 7 residui cisteinici altamente conservati nella sua struttura e un residuo istidinico lega 2 ioni zinco (Zn^{2+}). Il Dominio RING ha attività di E3 – Ubiquitina – ligasi e la sua attività viene amplificata dal legame con la proteina BARD1[63]. BARD1 possiede un dominio RING e α – eliche fiancheggianti lo stesso, similmente a BRCA1 e l'interazione fra questi domini e le α – eliche determina sia l'orientamento del dominio nello spazio, sia la sua stabilizzazione. L'E2 – Ubiquitina ligasi si lega alla regione core costituita dall' α – elica ed interagisce con i due ioni zinco, diametralmente opposta a BARD1, con cui non ha interazioni[63]. L'enzima E2 così legato viene avvicinato mediante l'interazione BRCA1/BARD1/E2 al substrato e permette il legame della molecola di ubiquitina attivata in precedenza dall'enzima E1. L'attività di ubiquitina ligasi è rivolta verso CtIP, l'istone H2A, così da determinare l'avvio del riparo del DNA, l'attivazione genica o la condensazione del genoma. Le mutazioni di rilevanza clinica a questo livello riguardano prevalentemente le regioni di coordinazione con gli ioni zinco, portando ad una riduzione dell'attività di Ubiquitina – ligasi e di precipitazione di BRCA1 – BARD1[63]. Una ulteriore regione caratterizzata da diverse mutazioni, potenzialmente molto deleterie è la regione degli esoni 11 – 13, che interagisce con PALB2, RAD51, c – Myc, pRB, presentando un'azione pleiotropica nella repressione del cancro[63].
- Sequenze di localizzazione nucleare (NLS). Mutazioni a livello delle NLS determinano una errata interazione con le importine e conseguente localizzazione citoplasmatica di BRCA1, con inevitabile perdita dell'attività di riparo del DNA e di risoluzione delle aberrazioni cromosomiche[63].

- Sito di fosforilazione a livello della Serina (S988).
- Dominio con α – elica coiled – coil per il legame con il fattore PALB2, mutazioni a questo livello ne compromettono l'interazione con PALB2[63].
- Dominio SCD contenente 10 siti per la fosforilazione mediata da ATM. La fosforilazione di questa regione favorisce il richiamo e l'assemblaggio di BRCA1 nei siti di rottura e mutazioni nella sequenza sono state identificate a livello clinico, determinando una probabile mancata localizzazione di BRCA1 a livello delle DSBs[63].
- BRCT, sito di legame per le proteine Abraxas (BRCA1 – A), CtIP (BRCA1 – C), BRIP1 (BRCA1 – B). BRCT è il terzo dei tre domini, congiuntamente a RING e agli esoni 11 – 13, con il maggior numero di mutazioni[63], rappresenta uno scaffold per l'interazione con i residui di pSer e pThr fosforilati da ATM – ATR. L'alterazione a questo livello riduce la capacità di formazione degli innumerevoli complessi in cui gioca un ruolo BRCA1[63].

Il gene BRCA2 rappresenta un potente oncosoppressore cellulare, proteina di notevoli dimensioni, costituita da 3418 residui amminoacidici e codificata dal gene omonimo, costituito da 70 esoni. La proteina BRCA2 presenta un ampio ventaglio di attività a livello del ciclo cellulare, nel riparo, nella protezione e nella segregazione del genoma. La struttura proteica è costituita da domini funzionali ben codificati, che possiamo enumerare procedendo dall'N – T verso il C – T:

- Sito di legame per PALB2.
- Otto sequenze BRC ripetute che fungono da sito di legame per RAD51.
- DNA – Binding Domain (DBD), regione contenente un dominio elicoidale per il legame con sequenze a ssDNA e dsDNA.
- Tre sequenze OB (Oligonucleotide Binding), inframmezzate da un Dominio T (Tower Domain), la cui funzione è quella di facilitare il legame con il DNA.
- Al Carbossi – terminale risultano tre sequenze di localizzazione nucleare (NLS) e un sito di fosforilazione CDK – dipendente, di cui è stata chiarita l'attività di legame nei confronti di RAD51.

BRCA2 rappresenta il cuore del meccanismo di Riparo mediante omologia, fungendo da principale proteina scaffold per la ricombinasi RAD51 a livello delle DSBs. Il dominio DBD può essere concettualmente esteso ai domini OB1 – 2 – 3 e al Dominio T, che in maniera congiunta permettono il legame con il ssDNA[64]. Gli OB1 – 2 – 3 rappresentano tre sequenze caratterizzate dalla presenza di 5 β – foglietti antiparalleli alternati ad un'estremità da un' α – elica all'altra da una tasca di legame

“binding cleft” che permettono un miglior ancoraggio del ssDNA, le strutture così ottenute vengono definite “ β – barrels”[64]. Gli otto domini BRC permettono la polimerizzazione di RAD51, velocizzando il disassemblaggio delle proteine RPA di protezione dei monconi di ssDNA, mantengono la forma attiva polimerizzante del RAD51 (inibendo l'idrolisi dell'ATP) e bloccano la nucleazione del filamento sul dsDNA[65][66].

La predisposizione genetica al cancro del seno è spesso legata a mutazioni germinali su BRCA1 e BRCA2, le quali sono state stimate con una prevalenza rispettivamente dell'0.85% e dell'1.29% in donne affette da cancro al seno[62]; inoltre, le mutazioni in questione sono state associate ad un alto rischio di cancro al seno, OR = 7.62 (95% CI, 5.33 to 11.27) per BRCA1 e OR = 5.23 (95% CI, 4.09 to 6.77) per BRCA2[62]; ulteriori studi hanno stimato il life – time risk per il cancro al seno correlato a varianti patogenetiche di BRCA1 e BRCA2 superiore al 60%[52]; inoltre, il rischio di sviluppare cancro al seno, entro i 70 anni è stato stimato in un ulteriore studio compreso fra il 55% e il 75% in relazione a PVs di BRCA1 e 45% - 69% per PVs su BRCA2, contro un rischio generale della popolazione del 12%[67]. Collimano con questi dati anche altre valutazioni che definiscono un life – time risk per l'insorgenza del cancro al seno del 70% – 80% nei portatori di BRCA1 mutato e del 50% – 60% nei soggetti BRCA2 mutati[65]; nonché del 50% per il cancro all'ovaio nei BRCA1 mutati e similmente del 30% per i BRCA2 mutati[65]. Come possiamo desumere i dati concordano fra loro nel definire un alto rischio di sviluppare neoplasia mammaria in soggetti con mutazioni germinali su BRCA1 – 2 rispetto alla popolazione sana.

2.1.4. Meccanismo molecolare del sistema DDR (DNA Damage Response):

Le DSBs presenti a livello del genoma vengono riconosciute da specifici sensori cellulari, in particolare dal Complesso MNR, il quale favorisce l'attività di fosforilazione della proteina ATM[56]. ATM fosforila l'istone H2AX, ponendo le basi per il successivo riparo del DNA[56] e facilitando, mediante specifici mediatori il richiamo di ulteriori complessi MNR. La fosforilazione dell'istone H2AX ne permette la successiva ubiquitinazione e metilazione, con assemblaggio delle proteine 53BP1, che nella fase G1 del ciclo cellulare permettono l'avvio del NHEJ e il blocco della HR[56]. L'assemblaggio di 53BP1 è mediato anche dalla fosforilazione della stessa proteina da parte di ATM[57], permettendo così la polimerizzazione in prossimità dei monconi di DNA fiancheggiati le DSBs[56]. 53BP1, che riconosce il sito di danno, si lega dopo essere stata fosforilata, con altre proteine, fra cui RIF1[56], che si lega all'N – T di 53BP1 a livello dei siti fosforilati da ATM, permettendo, il blocco della resezione dei monconi di DNA e impedendo l'avvio della HR[56]. Il legame a livello cromatinico dei complessi 53BP1 – RIF1 blocca l'associazione di BRCA1 con MNR

e CtIP, bloccando di fatto la resezione esonucleasica dei monconi di DNA a livello della DSBs e conseguenzialmente l'HR[56]. L'ingresso in fase S del ciclo cellulare determina la fosforilazione CDK – dipendente e probabilmente ATM – dipendente di CtIP, con successiva attivazione del complesso con BRCA1 – MNR e avvio della Ricombinazione Omologa[56]. Il complesso proteico BRCA1 – BARD1 viene reclutato a livello delle DSBs con l'attivazione del sistema DDR (DNA Damage response) e la sua primaria attività consta nell'ubiquitinazione dell'istone H2A, permettendo il distacco della proteina 53BP1[68], la quale determina il processamento da parte del NHEJ, piuttosto che l'avvio della HR. Studi recenti hanno messo in evidenza che l'attività di defosforilazione mediata da BRCA1, PP4C – dipendente, determina il distacco di RIF1 e il disassemblaggio di 53BP1[57]. Risulta interessante la quasi completa riattivazione dell'HRR in cavie ingegnerizzate, in cui si determina il knock – out del gene per 53BP1, suggerendo come una delle preminenti attività di BRCA1 – BARD1 sia proprio quella di indirizzare la cellula verso il riparo guidato dall'omologia, scalzando 53BP1 dal suo legame con il DNA[68]. A questo punto, uno dei differenti complessi di BRCA1 entra in gioco: BRCA1 – A (Abraxas, RAP80), lega la catena di Poli – U sull'istone H2A, dopo la fosforilazione dell'istone H2AX [65]. L'ubiquitinazione dell'istone H2A da parte della E3 – ubiquitina – ligasi (RNF168) è mediata dall'iniziale attività di BRCA1 – BARD1 come E2 – ubiquitina ligasi. Il complesso BRCA1 – A facilita il richiamo di BRCA1 a livello delle DSBs e l'interazione di questo con l'endonucleasi CtIP mediante il dominio BRTC, che permette la co – localizzazione del complesso MRN (MRE11–RAD50–NBS1), questo complesso proteico è definito BRCA1 – C e avvia il taglio del DNA al 5' e ne regola la velocità di resezione, permettendo la formazione delle code di ssDNA al 3' [66][57]. Un'ulteriore importante relazione di BRCA1 è quella con PALB2, che permette la formazione del macro – complesso BRCA1 – PALB2 – BRCA2 – RAD51 (BRCA1 – P), consentendo la formazione dei foci di RAD51 e l'avvio dell'HR. Un ulteriore complesso, la cui funzione è poco nota BRCA1 – C, formato con la Topoisomerasi 2 – BP1 potrebbe favorire l'attivazione di ATR – CHEK1 con fosforilazione di BRCA1 e delle proteine associate, congiuntamente all'attività di fosforilazione svolta da ATM, reclutata dal danno, il che implementerebbe la formazione dei macro – complessi proteici, l'attivazione di p53 e la regolazione dei checkpoints del ciclo cellulare [65]. La molecola ponte per la formazione del macro – complesso BRCA1 – P è PALB2, che mediante un dominio coiled – coil all'N – T lega BRCA1 e mediante il proprio C – T lega l'N – T di BRCA2. Mutazioni di PALB2 o della chinasi CHEK2 determinano un deficit di assemblaggio dei foci di RAD51 e contestuale malfunzionamento dell'HR [65]. L'attività di BRCA1 – 2 è fondamentale anche per la riparazione di lesioni correlate al collasso delle forcelle replicative e non unicamente a danni indotti da radiazioni ionizzanti o stress genotossico, al punto

che alterazioni del meccanismo cui sottendono causano delezioni, traslocazioni, aberrazioni cromosomiche e instabilità telomerica.

È chiaro come la perdita di funzione delle proteine associate al riparo del danno causi un'aumentata predisposizione ai tumori. Il cancro non è ereditario, ma ciò che può essere trasmesso alla prole è l'aumentato rischio di sviluppare neoplasia. La perdita dell'eterozigosi (LOH) rappresenta la *driving force* a livello somatico che determina l'insorgenza di una linea cellulare potenzialmente neoplastica: l'incapacità di riparo del DNA permette la progressiva assunzione di mutazioni ulteriori (instabilità genomica) che guidano la cellule verso la trasformazione neoplastica. Alla base di questa perdita dell'eterozigosi vi è il modello del “Doppio colpo di Knudson”, in cui i soggetti presentano una mutazione monoallelica germinale, cui si aggiunge la LOH a livello somatico[63][54]. La presenza di mutazioni in omozigosi a livello germinale, in modelli murini ingegnerizzati, in particolare a seguito della perdita dell'esone 11 su BRCA1, determina morte a livello embrionale; similmente avviene per topi BRCA2 mutati [66]. Cavie ingegnerizzate con mutazioni puntiformi compromettenti la formazione del complesso BRCA1 – BARD1 (riduzione dell'attività dell'E3 ubiquitina – ligasi) vanno alternativamente incontro a morte embrionale precoce o predisposizione allo sviluppo di neoplasia [66]. Ulteriori valutazioni hanno rivelato come mutazioni orientate alla regione BRTC del BRCA1, impedendo l'interazione con CtIP, Abraxas o BRIP1 accelerino lo sviluppo di neoplasia mammaria e pancreatica [66]. Similmente mutazioni di BRCA1 sul dominio CC per l'interazione con BRCA2 causano mortalità a livello embrionale, se in omozigosi o un deficit di funzionamento del meccanismo di HR, con aumentata predisposizione all'insorgenza di neoplasia, in eterozigosi. Recenti valutazioni stanno delineando la possibile aploinsufficienza correlata all'eterozigosi di BRCA1/2, che pur non fungendo da driver primario, non mantengono la completa funzione propria degli alleli wilde – type, determinando instabilità genomica, stress a livello replicazionale e accorciamento telomerico [66]. La perdita dell'eterozigosi può riguardare anche: ATM, CHEK2, TP53, portando alla perdita del controllo e al bypass dei *check – points* del ciclo cellulare. L'attività dell'HR consta dell'utilizzo di un filamento stampo presente sul cromatidio non fratello del cromosoma omologo. L'attività HR consta di diverse fasi[77][78]:

- Fase presinaptica: precedentemente descritta, di identificazione del punto di rottura e di assemblaggio del complesso molecolare volto all'ottenimento dei monconi di DNA su cui polimerizzano proteine di “protezione”, RPA (Replication Protein A), che impediscono la degenerazione delle code.
- Fase sinaptica: rappresenta la fase di assemblaggio delle eliche destrogire di RAD51, che facilitano l'appaiamento con le basi complementari sul dsDNA, mediante la formazione di piccole discontinuità “transient ssDNA bubbles”. Tali discontinuità permettono lo scorrimento

fra ssDNA e il filamento stampo sul dsDNA, fintantoché le interazioni a ponte di idrogeno, a seguito del riconoscimento dell'omologia e appaiamento delle basi determinano l'arresto di tale scorrimento e la formazione di un complesso stabile.

- Fase postsinaptica: non appena formato il D – loop stabile si avvia la sintesi del filamento mancante, utilizzando come stampo il filamento appaiato della sequenza integra. La fase post sinaptica consta della risoluzione mediante taglio, con possibilità di crossing – over del materiale genomico.

2.1.5. Patogenesi e rischio legato ad altri geni frequentemente mutati nella HBOC Syndrome:

- PALB2: Il gene PALB2 codifica per una proteina ponte di interazione fra BRCA2 e BRCA1. L'interazione iniziale BRCA1 – PALB2 appare essenziale per il reclutamento di BRCA2 e consequenzialmente dei polimeri di RAD51 a livello delle DSBs [60], forme tronche di BRCA1 sono correlate a deficit importanti dell'attività di riparo[76]. La perdita in omozigosi di PALB2 è associata all'insorgenza di una condizione definita come Anemia di Fanconi, la perdita in eterozigosi definisce un aumento del rischio di cancro[69]. Uno studio condotto su 154 famiglie, con 362 soggetti caratterizzati da LOF per PALB2 ha dimostrato un rischio cumulativo di incidenza del cancro mammario nella donna entro i 70 del 35%[69]. Tale studio ha inoltre evidenziato come donne senza una storia familiare di cancro al seno, abbiano un rischio cumulativo entro i 70 anni del 33%, la presenza di almeno due famigliari con storia positiva per cancro al seno entro i 50 anni porta il rischio cumulativo al 58%[69]. Similmente il rischio cumulativo “life time” per l'insorgenza del cancro ovarico in soggetti con varianti patogenetiche sulla linea germinale è stato stimato, più recentemente, in una forbice che oscilla dal 40% al 60%[52]. Un *population based case – control study*, condotto su 32'247 donne affette da cancro al seno e 32'544 non affette (controllo), ha rilevato la presenza di varianti patogenetiche nella prima coorte in circa il 5% dei soggetti su 12 differenti geni e PALB2 ha una prevalenza dello 0,46% sul totale dei soggetti con cancro alla mammella[62]. Tale studio ha rilevato un maggiore rischio di sviluppare cancro al seno, correlato con mutazioni di PALB2 (Odds ratio = 3.83; 95% CI, 2.68 to 5.63); inoltre, ha rilevato un rischio cumulativo entro gli 85 anni, in soggetti PALB2 – mutati, per lo sviluppo del cancro al seno del 32%[62].
- ATM – CHEK2: ATM rappresenta una chinasi presente in forma inattiva multimerica, la cui autofosforilazione e acetilazione, determina il disassemblaggio dei multimeri e l'avvio della

sua attività nelle prime fasi della HRR[70] e di regolazione del ciclo cellulare. ATM risulta implicata in innumerevoli pathway molecolari, fra cui fosforilazione e attivazione di CHEK2, con conseguente arresto del ciclo cellulare; nonché nell'interazione con p53 e contestuale arresto a livello dei check – points cellulare e avvio dell'apoptosi[70]. ATM fosforila anche MDM2 bloccando la sua attività di E3 – ubiquitina – ligasi a livello di p53 e impedendone la degradazione mediante ubiquitinazione. La sua attività di fosforilazione è orientata anche verso H2AX e MDC1[70][74], permettendo così l'assemblaggio di BRCA1 – BARD1. Va infine ricordato come ATM determini una magnificazione della sua attività di fosforilazione e avvio dell'assemblaggio dei complessi protagonisti dell'HRR, mediante la fosforilazione di ATR (ATM – Related). Mutazioni germinali determinano, in omozigosi recessiva, l'insorgenza della Sindrome da Atassia – Teleangectasia, caratterizzata per l'appunto da atassia cerebellare, teleangectasie oculo – cutanee, immunodeficienza severa e contestuali infezioni sinupolmonari e in ultimo, una aumentata suscettibilità al cancro, specialmente a neoplasie ematologiche [70]. Diversi studi hanno messo in luce una predisposizione dei soggetti ATM – mutati in eterozigosi, nello sviluppo del cancro al seno, seppur con una frequenza solo leggermente aumentata rispetto alla popolazione sana [70]. La perdita dell'eterozigosi associata a diverse delezioni, che si localizzano a qualsiasi livello della struttura proteica è determinante a livello somatico nello sviluppo del cancro mammario. Ulteriori tumori associati alla perdita dell'attività di ATM sono il cancro al pancreas, della prostata, e del colon – retto e l'adenocarcinoma del polmone. In ultima analisi, risulta un rischio aumentato, per i soggetti con alterazioni della funzione di ATM pari al 25 – 30% per il cancro al seno e $\leq 5\%$ per il cancro dell'ovaio; similmente del 5% circa per il colon – retto e del 30% per il cancro prostatico[52]. Similmente a p53 anche la perdita di Atm e Chek2 (nel topo) determina la sopravvivenza in embrioni BRCA1 mutati, che andrebbero altrimenti in contro a morte embrionale, suggerendo come alterazioni della loro funzione riducano l'attività di controllo delle aberrazioni del genoma, di blocco del ciclo cellulare e dell'avvio della morte programmata da parte di complessi meccanismi cellulari che presentano proprio Atm e p53 alla base. Similmente a p53, troviamo ATM mutata con una frequenza consistentemente maggiore nei tumori BRCA1/2 mutati piuttosto che nei tumori sporadici che presentano i geni BRCA funzionanti, suggerendo, anche in questo caso come l'instabilità genomica sia alla base della perdita di funzione di ATM e della progressiva assunzione di malignità da parte della componente neoplastica[65]. Specifiche mutazioni di ATM sono associate ad un alto rischio di aumento del cancro della mammella (c.7271T>G)[75], altre varianti sono state associate ad un aumentato rischio di tumore pancreatico e prostatico[67][68]. La chinasi CHEK2 viene

attivata in seguito a fosforilazione da parte di ATM su specifici siti appartenenti al Dominio SCD, in particolare T68, con conseguente dimerizzazione, autofosforilazione e amplificazione dell'attivazione [59]. CHEK2 ha funzioni pleiotropiche che si esprimono nel blocco della progressione del ciclo cellulare mediante fosforilazione e inattivazione di specifiche cicline (Cdc25A e Cdc25D), regolazione dei processi trascrizionali e di progressione del ciclo cellulare mediante azione diretta su E2F – 1, interagisce con p53, bloccando la sua degradazione mediata da MDM2[59]. Un ulteriore ruolo, preminente nel riparo del DNA è correlato alla sua interazione con BRCA1, la quale definisce positivamente l'attività di riparo del DNA e promuove l'interazione fra BRCA1 – PALB2 – BRCA2[60]. Tra le principali mutazioni correlate a CHEK2 attualmente indagate abbiamo l'allele 1100delC, comune in Nord Europa, ulteriori delezioni che producono proteine tronche (IVS2+1G>A e del5395), associate con l'insorgenza del cancro al seno nell'Est Europa oppure una variante missenso (I157T), rilevata in Europa Centrale/Orientale. Interessante è che le mutazioni di CHEK2, presentando una penetranza incompleta, l'insorgenza del cancro è in tal senso maggiormente correlata a fattori epigenetici/ambientali[59]. In uno studio condotto su 7'496 (Cezary Cybulski *et al*) donne affette da cancro al seno la prevalenza delle tre più comuni delezioni è stata di circa il 3%, con un aumentato rischio di cancro correlato a tali alterazioni, OR = 3.5 (95% CI, 2.5 to 5.1); la mutazione missenso di cui sopra è stata evidenziata nel 7.1% dei soggetti affetti da cancro. Nei soggetti sani controllo (4'346) le delezioni sul gene CHEK2 sono state stimate all'0.8%, mentre la mutazione missenso al 4.9%[59]. Il medesimo studio ha messo in luce che:

- Il lifetime risk per donne con CHEK2 troncata, senza familiari affetti per neoplasia è del 20%, rispetto al 6% stimato della popolazione sana.
- Il lifetime risk per donne con un familiare di secondo grado affetto e CHEK2 troncata è del 28%. Il lifetime risk per donne con un familiare di primo grado affetto e CHEK2 mutata è del 34%, che diventa del 44% in caso di entrambi i familiari, di primo e secondo grado affetti da neoplasia.
- Il lifetime risk associato alla mutazione missenso I157T è stato stimato nel 9% e nel 12% nei pazienti senza familiari affetti e nei pazienti con familiarità per il cancro mammario.

Una ampia metanalisi ha messo in evidenza (Weischer *et al*) ha messo in luce un rischio cumulativo del 37% di sviluppare cancro mammario entro i 70 anni in soggetti con eterozigosi per 1100delC e familiarità, contro un rischio stimato dallo studio del 7.8% nella popolazione generale[60]. Similmente, donne con positività per per 1100delC e senza familiarità per il cancro al seno hanno un rischio di sviluppare il cancro stimato, entro i 70 anni del 21%[60].

- P53: La proteina p53, codificata dal gene PT53, localizzato sul braccio corto del cromosoma 17 (17p13.1) è costituita da 393 residui amminoacidici[72] e viene definita in maniera informale il “guardiano del genoma”, in virtù dell’importantissima funzione di ripristino del DNA e blocco della progressione di instabilità genomica cellulare. Se stimolata da stress ossidativo, alterazioni del genoma, ipossia, p53 viene fosforilata da ATM e ATR, ciò impedisce la sua ubiquitinazione da parte di MDM2 e la conseguente degradazione, determinandone al contrario la tetramerizzazione, il legame con il DNA e l’avvio della trascrizione di fattori che regolano[71][73]:

1. Ciclo cellulare, mediante trascrizione diretta del gene di p21, potentissimo oncosoppressore cellulare. P21 si lega alle CDKs (Cycline – Dependent Kinases), inibendone l’attività di fosforilazione e bloccando il ciclo cellulare. Agisce in maniera specifica bloccando la Ciclina D1 – CDK4 e la Ciclina E – CDK2, così da impedire la fosforilazione di pRb, l’avvio di specifici fattori di trascrizione (E2F) e “congelare” la cellula in fase G1[73], impedendo la progressione di cellule con danno al genoma e instabilità. Il blocco si evidenzia anche mediante repressione della Ciclina B/Cdc2 a livello del passaggio G2/Fase M. Tutto questo impedisce l’assunzione di mutazioni o l’acquisizione di errori potenzialmente attivanti su proto – oncogeni in cellule instabili.
2. Riparo del DNA, mediante l’espressione di specifiche proteine, avviando il sistema NER (Nucleotide Excision Repair).
3. Avvio dell’apoptosi, sia indirettamente, mediante legame di proteine anti – apoptotiche Bcl -2, Bcl - XL e Mcl -1, riducendone i livelli, sia determinando la trascrizione diretta di geni pro – apoptotici (Puma, Bax) o attivando per via esogena l’espressione di FAS – FASL e KILLER/DR5 che attivano le caspasi 8 e la via intracellulare connessa[73].
4. Risposta allo stress – ossidativo.
5. Regolazione della ferroptosi e dell’autofagia cellulare.

La presenza di un allele p53 difettoso o addirittura la completa assenza di funzione determina a livello cellulare l’accumulo di mutazioni, la tumorigenesi, la proliferazione, metastatizzazione e farmacoresistenza[73]. P53 regola anche il microambiente tumorale, determinando l’attivazione dei macrofagi in M1, con attività pro – infiammatoria e fagocitica, una sua inattivazione permette l’instaurarsi di un microambiente permissivo, dominato dai

macrofagi M2, nonché determina una riduzione della produzione interferonica, con riduzione dell'efficienza dei linfociti nel contrastare lo sviluppo del cancro[73].

Le mutazioni di p53 risultano fra le più comuni a livello dei tessuti cancerosi[71]. Fra le altre neoplasie associate a mutazioni di p53 questa sembra essere un potente impulso allo sviluppo di malignità nel cancro al seno, in particolare nel sottotipo basal – like e a livello ovarico nel carcinoma dell'ovaio sieroso di alto grado[71]. La mutazione a livello germinale di p53 configura un quadro definito Sindrome di Li – Fraumeni, in cui il soggetto è predisposto all'insorgenza precoce nel corso della vita di innumerevoli tipi di neoplasia; inoltre, le mutazioni di p53 caratterizzerebbero il 50% dei tumori sporadici (non germinali)[65][71]. Le alterazioni nella sequenza di TP53 sono prevalentemente mutazioni puntiformi, piccole delezioni e inserzioni, specialmente sugli esoni 5 – 8, importanti per la codifica del dominio di legame per il DNA. Mutazioni di frameshift sono presenti su tutta la lunghezza del gene. P53 presenta aploinsufficienza, per cui un singolo allele mutato determina una parziale privazione dell'attività del gene wilde – type[71]. La perdita dell'eterozigosi (LOH) e alla base della completa loss of function (LOF) presente nelle cellule maligne. La presenza di varianti patogenetiche (PVs) sul gene TP53 correla con un aumento del rischio di cancro al seno del 40%[52]. Per quanto riguarda il carcinoma dell'ovaio non si hanno dati conclusivi sul reale aumento del rischio di cancro rispetto alla popolazione sana; tuttavia, sappiamo che mutazioni di TP53 si evidenziano in percentuali prossime al 100% dei casi nel carcinoma sieroso di alto grado (HGS-OvCa), avente una prognosi pessima e un'aggressività elevata, mentre la forbice oscilla tra il 50% e il 100% in diversi studi, in relazione alla scarsa presenza nei tumori sporadici di basso grado o border – line[71]. Possiamo affermare quindi che un'alta instabilità genomica è correlata a mutazioni di TP53, le quali potrebbero essere sia il prodotto, sia la *driving force* di tale instabilità. I tumori del seno e dell'ovaio, associati a p53 mutato, appaiono caratterizzati da innumerevoli mutazioni e forte aggressività. Delezioni ed alterazioni di TP53 sono state osservate in tumori con ipermetilazione dei promotori di BRCA1/2 o delezioni degli stessi geni, suggerendo ulteriormente la correlazione con l'instabilità genomica e il deficit del sistema HRR. La presenza di p53 wilde – type, contestualmente alla completa perdita di BRCA1/2 conduce, nei topi, a morte dell'embrione in 2 o 3 giorni, attivando le vie di morte cellulare programmata di cui sopra, similmente la perdita di p53 definisce uno stimolo proliferativo cellulare che spinge la cellula “definitivamente” verso l'assunzione di malignità. Le mutazioni di p53 sono rare sulla linea germinale, comunemente associate a livello somatico con la perdita di BRCA1/2, che

determinando una forte instabilità genomica, favorendo la selezione di p53 mutato durante la progressione di malignità [65].

- Il gene BARD1 determina una predisposizione rara e si verifica in un paziente su 500, con un rischio assoluto di BC triplo negativo del 20 – 40%[52].
- RAD51C e RAD51D, questi geni codificano per proteine che appartengono ad una famiglia altamente conservata, per l'appunto RAD51, implicata nell'attività di ricombinazione omologa. Profondamente interconnessi all'attività di BRCA1/2 un deficit di questi geni implica il non corretto funzionamento dell'HDR e instabilità genomica in tutte le cellule caratterizzate da perdita dell'eterozigosi. Nello specifico, le mutazioni germinali (PVs) di questi geni sono state evidenziate nello 0.3% dei pazienti con carcinoma mammario e nell'1% dei soggetti con cancro ovarico. In uno studio di coorte retrospettivo[87], l'1% dei soggetti valutati presentava PVs per RAD51C/D, rispettivamente l'0.6% e lo 0,4% del totale degli individui inclusi (9'507 soggetti), nello stesso studio è stata messa in evidenza come meno del 70% dei tumori al seno o all'ovaio caratterizzati da mutazioni germinali per RAD51C/D presentassero un sistema HDR funzionante. Attualmente il lifetime - risk di sviluppare cancro al seno con mutazioni di RAD51C è stimato dalle linee guida ESMO al 20%, la stima è del 10% per il cancro all'ovaio, mentre RAD51D presenta life – time risk di sviluppare cancro al seno o all'ovaio pari al 10%[52]. Secondo le linee guida AIOM[39], il rischio di sviluppare cancro al seno per entrambi i geni oscilla fra il 17% e il 30%, il cancro ovarico presenta un rischio del 10 – 15% per RAD51C e del 15 – 20% per RAD51D[39].

Tabella 3. Rischio life – time associato a varianti patogenetiche (PVs) Risk reduction and screening of cancer in hereditary breast-ovarian cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guideline [52]:

	Cancro mammella:	Cancro tubo – ovarico:	Cancro pancreatico:	Cancro colon:	del	Altre tipologie di neoplasia:
ATM	25%-30%	≤5%	< 5%	No		Prostata 30%
BARD1	~ 20%	No	No	No		No
BRCA1	>60%	40%-60%	< 5%	No		No
BRCA2	>60%	15%-30%	< 5%	No		Prostata 33%
BRIP1	No	5%-10%	No	No		No
CDH1	(LBC) 40%	No	No	No		Cancro gastrico diffuso 35%-45%
CHEK2	25%-30%	No	No	15%		

PALB2	40%-60%	3%-5%	2%-3%	No	No
PTEN	40%	No	No	10%	Tiroide 20%; Endometrio 20%
RAD51C	20%	10%	No	No	No
RAD51D	10%	10%	No	No	No
STK11	40%	No	10%-30%	30%	Gastrico 30%; Sertoli-Leydig
TP53					10%-20%
TP53	40%	No	Possibile	Possibile	Sarcoma, cervello, leucemia, carcinoma corticosurrenalico.

2.1.6. Ereditarietà del cancro e prevenzione:

Si stima che il 5 – 10% delle neoplasie mammarie e il 10 – 20% di quelle ovariche presenti una base ereditaria, riconducibile a mutazione di specifici geni, fra cui i principali sono BRCA1 e BRCA2. La probabilità di trasmissione di queste mutazioni segue la genetica mendeliana ed è pari al 50% (trasmissione autosomica dominante). L'ereditarietà è in realtà correlata alla trasmissione di una predisposizione, non del cancro stesso. La consulenza di genetica oncologica (CGO) nasce con la finalità di individuare se presente, in famiglie con numerosi casi di neoplasia mammaria/ovarica in particolare, la predisposizione genetica all'insorgenza del cancro. Nelle fasi iniziali di valutazione della familiarità di un soggetto è necessario raccogliere informazioni sui parenti prossimi e sull'età della diagnosi delle neoplasie, così da valutare se inviare o meno il paziente alla Consulenza oncogenetica, in cui si procederà alla ricostruzione dell'albero familiare, con un massimo grado di approfondimento fino a 4 generazioni per il ramo materno e paterno. L'obiettivo che si pone la consulenza oncogenetica nell'individuare le mutazioni predisponenti all'insorgenza del cancro è quella di orientare la paziente verso percorsi di sorveglianza o trattamenti chirurgici profilattici, al fine di abbattere notevolmente il rischio di insorgenza o diagnosi specialmente in fase avanzata del tumore[49][86]. Un principio fondamentale è che la valutazione genetica del rischio è appropriata solo se correlata alla presenza di strumenti di prevenzione o abbattimento del rischio (la salpingo - ovariectomia bilaterale riduce il rischio di neoplasie ovariche del 95%, similmente la mastectomia bilaterale riduce il rischio di sviluppo del cancro mammario del 90 – 95%). I criteri di invio alla CGO tiene conto di diversi fattori[49]:

1. Numero di parenti affetti.
2. Rapporti di parentela tra gli affetti.
3. Età dello sviluppo della neoplasia.
4. Parenti affetti da tumori bilaterali o multipli.
5. Caratteristiche istologiche delle neoplasie.

2.1.7. CGO (Consulenza di Genetica Oncologica) – pre - test:

La consulenza di genetica oncologica pre – test presenta precisi capisaldi:

- Si procede con la ricostruzione dell'anamnesi oncologica personale e/o familiare, valutando che il paziente abbia ben compreso le motivazioni che lo hanno condotto alla CGO.
- Si ricostruisce l'albero familiare, mediante informazioni il più possibile attendibili, fino al terzo grado di parentela.
- Spesso si procede con la rivalutazione di esami precedentemente eseguiti, ad esempio istologici ed eventualmente nuovi esami strumentali e nel quadro di una rivalutazione clinica complessiva, si decide se effettuare e che test effettuare.
- La scelta del probando da sottoporre al test passa generalmente per un'attenta analisi, con una tendenza a testare i soggetti malati che hanno già sviluppato la malattia o con più alta probabilità di mutazione (es. età di insorgenza della malattia) in famiglia, così da escludere, qualora il test fosse negativo, la riconducibilità della storia oncologica a mutazioni sui geni analizzati.
- Se il test risulta positivo, i familiari possono giovare di una ricerca mirata su quello specifico gene, abbattendo i costi. Se invece viene testato un membro sano della famiglia, la negatività del test per una mutazione non nota non esclude la presenza della mutazione in altri membri della famiglia.
- Importanti obiettivi del counselling pre – test sono: valutare benefici e limiti del test, valutare il rischio a priori di mutazione, mediante strumenti e software validati, esporre al paziente le possibili alternative di sorveglianza o trattamento, discussione delle implicazioni per i familiari e infine raccolta del consenso all'esecuzione del test.

2.1.8. Test genetico di laboratorio:

Il test genetico di laboratorio viene generalmente eseguito mediante il prelievo di sangue periferico e dalle cellule nucleate (leucociti), viene estratto il DNA che viene mediante tecniche di biologia molecolare processato. Attualmente abbiamo diverse tipologie di test – genetico, ciascuna con indicazioni differenti[43]:

- Il sequenziamento diretto del tratto di interesse, mediante metodo tradizionale Sanger (utilizzabile per analisi di un singolo gene per la ricerca della VP familiare).

- Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA), tecnica che consente la ricerca di grossi riarrangiamenti sbilanciati, ad esempio delezioni/duplicazioni, tale tecnica viene eseguita in maniera mirata sui singoli geni nel momento in cui la VP che è stata identificata in famiglia possa essere indagata con questa metodica.
- Pannelli multigenici con metodo NGS: i pannelli possono comprendere un numero più o meno elevato di geni, implicati nell'HBOC, nei deficit del MMR, oppure ad numero ancor più ampio di geni di predisposizione a neoplasie. La metodica NGS può anche individuare ampie delezioni/duplicazioni, se correttamente calibrata.
- Vi sono poi tecniche specifiche per l'individuazione di alterazioni altrettanto specifiche, come l'ipermetilazione costituzionale di MLH1.

2.1.9. Risultato del test e counseling post – test:

Il reale significato di una variante dei geni di predisposizione è definito da standard internazionali e il sistema di classificazione delle varianti più utilizzato, redatto dal gruppo IARC (International Agency for Research on Cancer) e dall'American College Medical Genetics and Genomics in collaborazione con l'Association for Molecular Pathology (ACMGG-AMP), suddivide le varianti in 5 categorie con le relative probabilità di essere patogenetiche [reference]:

- Classe 5: patogenetica (>0.99)
- Classe 4: probabilmente patogenetica ($0.95 - 0.99$)
- Classe 3: di incerto significato (Variant Uncertain Significance o "VUS") ($0.05 - 0.094$)
- Classe 2: verosimilmente non patogenetica o di scarso significato clinico ($0.001 - 0.049$)
- Classe 1: non patogenetica o nessun significato clinico (<0.001)

Una variante patogenetica è associata ad un alto rischio di cancro, superiore rispetto a quello della popolazione generale, descritta per i singoli geni. Conoscere la presenza di VP determina una variazione nell'iter di prevenzione e trattamento[39]. Va tenuto in considerazione che le varianti vengono costantemente riclassificate in relazione a nuove evidenze: la quasi totalità delle revisioni riguarda varianti probabilmente patogenetiche o probabilmente benigne e le VUS. Il risultato viene comunicato dopo che il paziente ha espresso la volontà di conoscere il risultato. Il risultato del test può essere:

- Test positivo: in caso di identificazione di una mutazione a significato patogenetico noto.
- Test dubbio: in caso di una mutazione in cui la letteratura non definisca una associazione patogenetica fra mutazione e cancro.

- Test non informativo: nel caso non vengano rilevate mutazioni, in relazione al limite delle metodiche di indagine, a mutazioni su geni diversi, non indagati o attualmente non conosciuti.
- Test negativo: assenza di una mutazione rilevata in famiglia e appositamente indagata.

Il risultato del test va discusso con il paziente, qualora fosse positivo andranno esposte tutte le possibili alternative di sorveglianza o trattamento profilattico, contestualmente andrà informato del fatto che dovrebbe informare i familiari sulla possibilità di eseguire il test in relazione al proprio esito positivo. Qualora il test fosse non informativo va sottolineata la possibilità che l'analisi limitata ad alcuni geni o le metodiche attualmente disponibili non permettono di escludere, se non per l'analisi eseguita, la presenza di mutazioni VP[49]. In caso di risultato dubbio, come detto sopra, le varianti vengono continuamente riclassificate ed è quindi utile un aggiornamento con il probando in tal senso [49][39]. Va ricordato che le capacità e l'esperienza del medico, in relazione alle conoscenze disponibili, sui test utilizzati, sulla probabilità a priori e posteriori di mutazione, eterogeneità della neoplasia, possono portare alla definizione di un alto rischio genetico pur in assenza di una mutazione[49].

L'approccio Mainstreaming Cancer – Genetics – MGC indica un nuovo percorso diagnostico – terapeutico, in cui il paziente è indirizzato immediatamente alla consulenza genetica quando il risultato del test può essere di importanza per l'oncologo. Il nuovo percorso così definito facilita l'accesso alla consulenza e accorciandone i tempi[49].

2.1.10. Criteri di invio alla consulenza genetica e aspetti relativi al test:

Con la finalità di identificare precocemente i soggetti portatori di VP ha uno scopo terapeutico e di screening, date le evidenze in letteratura, che mostrano un tasso rilevante di varianti identificate in donne con carcinoma insorto sotto i 40 anni ed in pazienti con tumore triplo – negativo (indipendentemente dall'età), le recenti linee guida AIOM hanno aggiornato le soglie sull'età con carcinoma mammario, estendendo anche alla fascia 36 – 40 anni il test, in relazione alla positività ai criteri di accesso identificati.

Tabella 4. Criteri di accesso identificati dalle linee guida AIOM, (Sindromi di predisposizione ereditaria ai tumori: tumori associati ai geni della ricombinazione omologa, edizione 2025):

Storia personale di:

1. Carcinoma mammario maschile

2. Donna con carcinoma mammario e carcinoma ovarico
3. Donna con carcinoma mammario ≤ 40 anni
4. Donna con carcinoma mammario triplo negativo
5. Donna con carcinoma mammario bilaterale ≤ 50 anni
6. Donna con carcinoma ovarico non mucinoso e non borderline a qualsiasi età
7. Adenocarcinoma pancreatico metastatico
8. Carcinoma prostatico metastatico
Storia personale di carcinoma mammario < 50 anni e familiarità di primo grado ^{a,b} per:
Carcinoma mammario ≤ 50 anni
Carcinoma ovarico non mucinoso e non borderline a qualsiasi età
Carcinoma mammario bilaterale
Carcinoma mammario maschile
Carcinoma pancreatico
Carcinoma prostatico
Storia personale di carcinoma mammario > 50 anni e familiarità per carcinoma mammario, ovarico, prostatico o pancreatico in 2 o più parenti in primo grado ^{a,b} tra loro (di cui uno in primo grado con la probanda ^{a,b})
Storia personale di carcinoma prostatico e familiarità per:
Almeno un parente di primo grado ^a con carcinoma prostatico non Grade Group 1 ^c in età ≤ 60 anni
Almeno 2 membri della famiglia con carcinoma prostatico non Grade Group 1 ^c in età ≤ 50 anni
Storia familiare di tumore del pancreas:
Almeno 2 parenti di primo grado ^a con adenocarcinoma del pancreas ^d
Almeno 3 membri della famiglia con adenocarcinoma del pancreas ^e
In presenza di criteri di accesso al test per le sindromi genetiche con un aumentato rischio di carcinoma
Storia familiare di: Variante patogenetica nota in un gene predisponente in un familiare

a Parenti di primo grado = genitori, fratelli/sorelle e figli.

b Per i tumori mammari e ovarici, nel lato paterno della famiglia considerare anche familiari di secondo grado (nonna, zie).

c Grade Group 1 (Gleason 3 + 3 = 6) secondo ISUP (8).

d La condizione non interessa la situazione in cui entrambi i genitori sono/sono stati affetti.

e Sulla stessa linea di sangue e con almeno un parente di primo grado.

Il 18% circa delle neoplasie mammarie è legato a familiarità, mentre il 13% dipende da una predisposizione direttamente ereditata[51][53]. Il test genetico può essere eseguito sia su materiale neoplastico fissato in formalina e incluso in paraffina, sia su sangue venoso periferico. La possibilità di eseguire i test su matrici differenti risponde alla necessità di identificare le varianti alleliche dei diversi geni sulla linea somatica, piuttosto che su quella germinale. L'indagine molecolare deve garantire una qualità adeguata, soprattutto in relazione ai pannelli multi – gene, che potrebbero avere una ridotta sensibilità non indagando regioni cosiddette *missed* o per mancata ricerca di anomalie nel numero di copie (delezioni/duplicazioni di singoli esoni o introni). BRCA1, BRCA2 e gli altri geni correlati alla ricombinazione omologa presentano VP da perdita di funzione (non-senso e frameshift con inserzione di codoni prematuri di stop, ai siti di splicing, missenso, delezioni/duplicazioni di esoni singoli o multipli e meccanismi mutazionali più rare). I test devono in ogni caso garantire:

1. L'analisi dell'intera regione codificate e delle giunzioni esone – introne (+/- 10 o 20 bp), per la ricerca di varianti nucleotidiche.
2. La ricerca di delezioni/duplicazioni di esoni singoli e multipli (CVNs).

L'interpretazione del dato trovato viene effettuato alla luce di criteri ACMG/ENIGMA da personale qualificato, con esperienza e attraverso la consultazione delle banche dati e della letteratura scientifica disponibile. Tra i geni a penetranza alta – moderata andrebbero considerati: CDH1, associato al tumore gastrico diffuso e al carcinoma lobulare della mammella, con un rischio assoluto di sviluppare cancro mammario compreso tra il 41 – 60%. PTEN, associato a sindrome di Cowden e rischio assoluto per il cancro mammario del 40 – 60%. STK11, associato alla sindrome poliposica di Peutz – Jeghers, con rischio assoluto di cancro mammario stimato tra il 32% e il 54%. TP53, correlato alla Sindrome di Li – Fraumeni, con rischio assoluto di cancro al seno > 60%.

Va ricordato che geni coinvolti nel pathway di ricombinazione omologa, correlati all'insorgenza soprattutto di tumori mammari/ovarici presentano dati di prevalenza delle varianti ancora oggetto di studio e sono frequentemente analizzati nei pannelli multigene, con la possibilità di introduzione di ulteriore incertezza sul nesso genotipi/fenotipo, al riscontro di “VUS”; tali geni sono: ATM, BARD1, BRIP1, CHEK2, PALB2, RAD51C, RAD51B.

Il sequenziamento del DNA avviene, per i pannelli multigenici, mediante tecniche NGS che devono tener conto, nell'ambito della valutazione somatica di[39][41]:

1. Un'adeguata cellularità neoplastica del campione (>25%), con esclusione di aree con neoplasia poco rappresentata. Da ogni cellula nucleata si estraggono circa 6 pg di DNA genomico e per ottenere i 10 ng necessari deve essere possibile estrarre DNA da circa 2000 cellule neoplastiche, pari ad un volume totale di 0.25 – 1 mm³.
2. Adeguata estrazione e purificazione del DNA da inclusi.
3. Corretta quantificazione e sequenziamento, valutando quantità e qualità dell'acido nucleico, onde evitare errori nel sequenziamento o incapacità di processamento del campione. Da tenere in considerazione l'autolisi o la cariolisi cellulare nella valutazione a livello somatico, poiché impattando sulla quantità di DNA determina problematiche relative alla valutazione del numero di copie o di grossi riarrangiamenti genetici.

La valutazione germinale su sangue periferico di norma non richiede grandissimi accorgimenti, in quanto eseguita su sangue fresco. Le attuali linee guida AIOM raccomandano[42]:

- Tumore alla mammella: esclusivo test su sangue intero, per identificare mutazioni germinali. Non è raccomandato il test sulla linea somatica se non ai fini di ricerca.
- Tumore epiteliale dell'ovaio non mucinoso e non borderline: è attualmente indicato il test sul tessuto tumorale per la valutazione di un'eventuale terapia con PARP – inibitori, mentre la valutazione sul prelievo ematico permette di evidenziare una variante costituzionale che indirizza al trattamento con programmi di sorveglianza clinico – strumentale o l'effettuazione di strategie di riduzione del rischio. Tale valutazione andrebbe fatta anche in caso di carcinoma peritoneale primitivo o delle Tube di Falloppio.
- Adenocarcinoma pancreatico: andrebbe eseguito il test su BRCA su sangue periferico, in relazione al terapeutico che potrebbe avere in soggetti già in trattamento con composti a base di platino. I tempi per la refertazione devono essere congrui. Laddove non fosse indicato a fini terapeutici è comunque consigliabile valutare BRCA a scopo preventivo.
- Carcinoma prostatico: nel carcinoma prostatico si consiglia di effettuare il test genetico sia sul tessuto tumorale sia sul sangue periferico, al fine di definire un percorso di cura adeguato e intraprendere un percorso di consulenza oncogenetica ai familiari.

2.1.11. Management operativo dei pazienti affetti da mutazioni predisponenti all'HBOC:

Le donne e gli uomini con mutazioni sulla linea germinale dei geni BRCA1/2 presentano un rischio aumentato di sviluppare cancro mammario, come sopra riportato. Le neoplasie sono tendenzialmente ad insorgenza precoce (< 40 anni), aggressive (G3, ad alta attività proliferativa, assenza di espressione

di recettori ormonali). In questi soggetti si evidenzia un'aumentata frequenza di sviluppare secondi tumori metacroni, sia ipsi - , sia controlaterali. Le opzioni per la riduzione del rischio di cancro al seno sono[39]:

- Farmacoterapiche: la farmacoprevenzione con tamoxifene è approvata come off – label in Italia.
- Stili di vita: esposizione endogena a ormoni (storia riproduttiva, terapia estroprogestinica, allattamento, durata del periodo fertile), stile di vita (alimentazione, alcool, BMI, attività fisica) e ambiente sono tutti fattori di rischio che andrebbero evitati a maggior ragione nei soggetti BRCA – mutati, così come una corretta alimentazione, attività fisica e BMI possono essere fattori protettivi.
- Chirurgia profilattica: a soggetti con BRCA1/2 mutati o geni ad alto rischio (PALB2, TP53, PTEN, STK11, CDH1) andrebbe offerta la MRR (mastectomia profilattica bilaterale), con una riduzione stimata del rischio di nuovo cancro al seno del 90 – 95%. Anche in donne con carcinoma mammario in atto o anamnesi la MRR determina una netta riduzione di reinsorgenza del tumore. Andrebbe tenuto conto anche dell'età della paziente (< 40 anni, il rischio di secondo tumore è molto elevato). Il rischio di recidiva ipsilaterale a 10 anni è stimato al 17.3% nei soggetti BRCA – mutati e all'11% nei casi controllo, con un aumento del rischio di ricorrenza ipsilaterale del cancro a partire dai 7 anni dal trattamento chirurgico, in cui i tassi di ricorrenza si differenziano nettamente. Lo stesso studio ha indicato un rischio nettamente aumentato di sviluppare tumore nel seno controlaterale (RR 3.56, 95 % CI 2.50–5.08)[45]. Tra i fattori protettivi identificati dallo studio riguardo l'insorgenza di cancro mammario controlaterale, sono stati messi in evidenza: età, ovariectomia, CHT, ET con Tamoxifene. Considerando che il rischio cumulativo di sviluppare una neoplasia mammaria entro gli 80 anni per quanto riguarda BRCA1 è del 72%, mentre per BRCA2 è del 69% e considerando che il rischio di sviluppare un tumore al seno controlaterale entro i 20 anni dalla chirurgia è stato stimato nel 40% per BRCA1 e nel 26% per BRCA2[46], la possibilità di un trattamento più aggressivo, con mastectomia bilaterale profilattica andrebbe considerata con la paziente e il test genetico per, nelle pazienti elegibili, eseguito entro 4 settimane.

Per quanto concerne il cancro ovarico[39]:

- Mutazione dei geni BRCA1/2 riguardano il 10 – 15% delle donne con cancro ovarico e correlano maggiormente con tumori sierosi di alto grado.

- Farmacoprevenzione: la terapia estro - progestinica assunta per un periodo di almeno 5 anni ha effetti protettivi consolidati (riduzione del 50% del rischio di sviluppare CO) ed è un'opzione nelle donne che hanno sviluppato CM.
- Stili di vita: fumo di sigaretta e BMI nella norma sono fattori protettivi.
- Chirurgia di riduzione del rischio: la salpingo – ovariectomia è l'intervento di scelta nelle donne a 35 – 40 anni, al termine del desiderio di concepimento con mutazioni di BRCA1, mentre nel caso delle mutazioni di BRCA2 la chirurgia può essere ritardata di 5 – 10 anni in relazione all'insorgenza più tardiva del cancro. La riduzione complessiva di insorgenza di tumori ovarico – peritoneo – tubarico è dell'80 – 90%. La riduzione del rischio di tutte le cause di mortalità è del 77%. In alcuni casi specifici può essere presa in considerazione l'isterectomia profilattica, in ragioni di VP di BRCA1/2, data una debole e controversa associazione con il cancro dell'endometrio. A sostegno dell'incapacità dello screening di diminuire la mortalità da cancro ovarico in soggetti mutati, un ampio studio randomizzato – controllato, pubblicato sul JAMA, che ha coinvolto più di 70'000 pazienti ha mostrato una mortalità fra gruppo sottoposto a screening (dosaggio CA125 annuale per 6 anni ed ECO – TV annuale per 4 anni), comparabile con le pazienti non sottoposte a screening di cui sopra[47].

Per quanto riguarda il carcinoma esocrino del pancreas (CPa)[39].

- La presenza di VP su BRCA1/2 presenta un aumento rischio compreso tra il 5% e il 10%.
- Stili di vita: il fumo di sigaretta, l'obesità, la dieta (alto consumo di grassi), la ridotta attività fisica, la scarsa assunzione di verdure e frutta, il consumo di alcool, il DM, la pancreatite cronica, DM2 e una pregressa gastrectomia rappresentano fattori di rischio. Risulta molto complesso discriminare l'influenza dei fattori esogeni e della componente genetica.
- La chirurgia profilattica, di natura eminentemente conservativa (pancreasectomia distale o duodenocefalopancreasectomia) non è consigliata di routine, in relazione al rapporto rischi/benefici e in diversi contesti si assiste ad un gesto chirurgico demolitivo (pancreasectomia totale), non risparmiando il parenchima sano, basandosi su non ben documentati benefici. La chirurgia profilattica trova piede nel momento in cui si ha la comparsa di lesioni pre - maligne o tumori conclamati in corso di sorveglianza sul parenchima[39].

Le attuali linee guida AIOM definiscono, seppur in assenza di evidenze di studi prospettici randomizzati, la MRR o la MPC come gli strumenti più adatti a ridurre la mortalità e prevenire il CM, infatti, si basano su di studio di coorte pubblicato da Heemskerk – Gerritsen et al. in cui si stima

l'insorgenza/reinsorgenza del CM pari al 27% nelle donne sottoposte a sola sorveglianza con BRCA1 mutato, contro l'1% di quelle sottoposte a chirurgia; similmente del 19% rispetto allo 0% di quelle sottoposte a MRR in donne con BRCA2 mutato[39].

Quindi le linee guida, nel management dell'HBOC Syndrome raccomandano di prendere in considerazione, in paziente BRCA1/BRCA2 mutate, indipendentemente dalla presenza di malattia o meno, la mastectomia bilaterale come strumento maggiormente efficace di prevenzione primaria e/o recidiva, rispetto alla sorveglianza strumentale, correlandola ad una riduzione della mortalità associata. Similmente a quanto già affermato per la mammella, in caso di HBOC è consigliata dalla attuali linee guida la salpingo – ooforectomia profilattica bilaterale, tenendo conto del singolo caso e delle limitazioni correlate all'assenza di studi clinici randomizzati, risulta, basata sulle evidenze la raccomandazione ad eseguire chirurgia profilattica come unico strumento di riduzione dell'insorgenza e della mortalità di cancro tubo – ovarico nelle pazienti BRCA1/2 mutate.

2.1.12. Sorveglianza dei pazienti affetti da mutazioni predisponenti all'HBOC :

Per quanto concerne il cancro della mammella le metodiche attualmente indicate dalle linee guida ESMO prevedono l'utilizzo della RM come strumento di sorveglianza intensiva a partire dai 30 anni:

- Ogni 6 mesi nei soggetti BRCA1 mutati.
- Ogni 12 mesi nei soggetti BRCA2 mutati.

Qualora non fosse possibile una RM ogni 6 mesi, questa andrebbe alternata ad una ecografia o RX (rispettivamente fino dai 30 e dopo i 40 anni). Diversi studi hanno messo in luce un netto miglioramento della sopravvivenza per le donne sottoposte a sorveglianza con RM (95,3% a 10 anni), rispetto a nessun programma (73,7% a 10 anni) e dati sovrapponibili a sorveglianza con mammografia. Similmente è stata dimostrata una sopravvivenza media dell'85.5% a 10 nei soggetti sottoposti a sorveglianza intensiva e del 74.6% per i non sottoposti a sorveglianza intensiva. La riduzione della mortalità è stata stimata del 42 – 47/ con la sola mammografia e del 48 – 61% con la sola RM. Attualmente le procedure consigliate per la sorveglianza mammaria nelle donne portatrici di VP sui BRCA sono:

Tabella 5. Procedure consigliate per la sorveglianza mammaria delle donne portatrici di VP BRCA1/2 (Linee Guida AIOM 2025 – Sindromi di predisposizione ereditaria ai tumori):

Metodica

Ecografia mammaria semestrale dal momento della diagnosi genetica fino ai 69 anni

Mammografia annuale dai 35 anni fino ai 69 anni, poi biennale fino ai 74 anni

Risonanza magnetica mammaria annuale a partire dall'età di 25 anni fino ai 69 anni

In relazione al cancro ovarico, le attuali linee guida[39] raccomandano l'ovariectomia e la salpingectomia profilattiche laddove possibile, in relazione al fatto che il protocollo ROCA, consistente nel dosaggio del CA125 ogni 4 mesi (ogni 2 se i valori sono anormali), accompagnato da un'ecografia TV, ha mostrato dati inconclusivi in termini di sopravvivenza, seppur le diagnosi è di norma effettuata a stadi precoci (Stadio I e II), nel 77,8% (studio italiano, Gruppo di Modena sui tumori eredo - familiari). Quindi attualmente è consigliabile effettuare dosaggio CA125, Eco – TV ed esplorazione pelvica bimanuale ogni 6 mesi in caso di donne giovani (< 35 – 40 anni per BRCA1 e 40 – 45 anni per BRCA2) che non abbiano completato il proprio progetto riproduttivo.

2.1.13. Sindrome di Lynch:

La Sindrome di Lynch rappresenta la più frequente condizione di forme non poliposiche di cancro colon – rettale connessa a predisposizione genetica. I difetti genetici che caratterizzano la Sindrome di Lynch sono ascrivibili a mutazioni nei geni di Mismatch Repair (MMR)[43]. Lo spettro di tumori correlati alla Sindrome di Lynch riguarda il CCR, il carcinoma dell'endometrio, dell'ovaio, dello stomaco, del piccolo intestino, dell'uretere e della pelvi renale, con una prevalenza del CCR e del EC[43][44]. La prevalenza attuale di portatori di varianti genetiche della Sindrome di Lynch è stimata intorno a 1:279[43]. I soggetti portatori di mutazioni correlati alla sindrome di Lynch sviluppano precocemente CCR, in media 42 anni circa e CE, 44 anni circa, rispetto ai soggetti sani non portatori di VP per i geni del sistema MMR. Una quadro oncologico severo è rappresentato dalla cosiddetta CMMRD o “Sindrome da difetto costituzionale del Mismatch Repair”, caratterizzata da varianti bialleliche sui geni dell'MMR, con tumori colici (adenomi e adenocarcinomi), neoplasie ematologiche, CE, tumori cerebrali a insorgenza precocissima (18 – 20 anni circa)[43].

2.1.14. Basi molecolari della Sindrome di Lynch:

Le proteine appartenenti al sistema MMR hanno la funzione principale di correzione degli errori del DNA durante la replicazione e i processi di ricombinazione. Esistono due frazioni proteiche principali:

- MutS homologues: MSH2, MSH6, MSH3, MSH4, MSH5.

- MutL homologues: MLH1, PMS2, PMS1, MLH3.

I complessi macromolecolari formati dalle proteine di cui sopra sono rispettivamente:

- hMUS α : eterodimero MSH2, MSH6.
- hMUS β : eterodimero MSH2, MSH3.

Sia MSH6, che MSH3 presentano l'attività primaria di correzione di alterazioni legate a 1 – 2 nucleotidi ed entrambi concorrono alla correzione di errori di maggiori dimensioni rispetto a 2 singoli nucleotidi. Il complesso hMutL α (MLH1, PMS2) coordina l'attività di riconoscimento e successiva eliminazione dei nucleotidi anomali, previo legame con una “clamp” formata da hMUS α – hMUS β , legati ad ATP. Altri complessi analoghi sono hMutL γ (MLH3) e hMutL β (PMS1), la cui azione è orientata verso loop di inserzione/delezione nel DNA[43]. La Sindrome di Lynch è causata da una mutazione in uno dei 4 geni principali: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, raramente nel gene EPCAM. La mutazione della proteina EPCAM determina l'ipermetilazione del promotore con inattivazione del gene MSH2, similmente un ulteriore raro meccanismo è l'ipermetilazione del promotore di MLH1. L'ipofunzione del sistema MMR determina una frequenza maggiore di mutazioni somatiche e l'assunzione di mutazioni puntiformi sul genoma, in particolare in piccole regioni definite microsatelliti, fenotipo MSI – H (MicroSatellite Instability High). Alterazioni di MSH2, MLH1, PMS2 sono associate con un fenotipo MSI – H, con alterazioni delle ripetizioni tandem mononucleotidiche o dinucleotidiche, mentre alterazioni di MSH6 collimano con alterazioni delle ripetizioni mononucleotidiche e la disfunzione di MSH (hMutS β) è associata ad alterazioni di sequenze ripetute tetranucleotidiche[44]. Il sistema MMR è implicato anche nell'avvio dei processi di blocco della replicazione e apoptotici se il riparo del DNA non è possibile; inoltre, rappresenta una barriera ai riarrangiamenti cromosomici[44].

2.1.15. Test molecolari per la valutazione del deficit del complesso MMR:

Un primo test per la valutazione dell'instabilità microsatellitare viene effettuato su 5 marcatori genetici su DNA isolato da tessuto tumorale (Test MSI). La presenza di 2 o più loci alterati (> 30%) definisce un fenotipo MSI – H, mentre uno o più loci (> 0% e < 30%) definisce un fenotipo MSI – L; in ogni caso, si parla di sistema dMMR (defettivo), configurando la necessità di un test sulla linea germinale, per la definizione di un'eventuale Sindrome di Lynch[43]. Il secondo test è rappresentato dalla valutazione IC dell'espressione delle 4 principali proteine del sistema MMR: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2. Come per la valutazione sul DNA, l'alterata espressione proteica implica una instabilità del sistema di Mismatch Repair (dMMR). Test IC e Test MSI presentano una concordanza del 94%, sono pertanto intercambiabili. Il fenotipo dMMR è presente nel 10 – 15% dei casi, più del

70% - 80% dei casi sono sporadici, non associati a LS, ma a mutazione somatica di BRAF (V600E). BRAF è quindi utile per escludere la LS. MLH1 può essere raramente ipermetilato sulla linea germinale e se tale ipermetilazione è costituzionale essere trasmesso alla prole (l'ipermetilazione somatica di MLH1 esclude la SL). Rari casi di mutazione biallelica somatica possono determinare l'insorgenza del cancro.

Tabella 6. Rischio di sviluppare neoplasie stimato in relazione a mutazioni del sistema MMR* (Raccomandazioni AIOM – I tumori ereditari dello stomaco e del colon – retto/gennaio 2022):

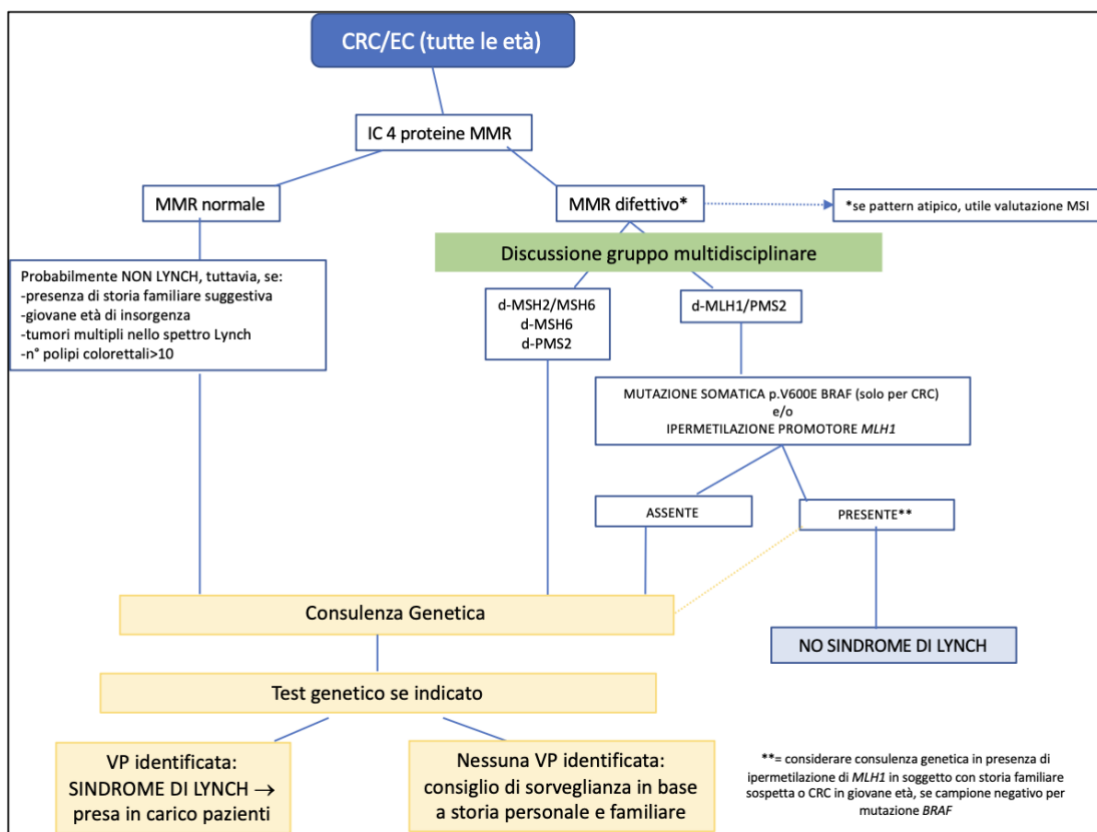
NEOPLASIA	RISCHIO (%)	POPOLAZIONE GENERALE (%)
CCR-uomini	20-74	
CCR-donne	10-53	4-5
Endometrio	14-54	2
Ovaio	4-20	1
Gastrico	6-9	<1
Intestino tenue	4-12	<1
Pancreatico	0.4-4	1
Vie epatobiliari	0.2-4	Raro
Tratto urinario	0.2-25	Raro

**Per il CCR (carcinoma coloretale) e il Carcinoma dell'endometrio è riportato il range per i 4 geni MMR. I rischi si differenziano tra MLH1/MSH2 (più alti) e MSH6/PMS2 (più bassi).*

Generalmente si procede con valutazione IC o test MSI su tutti i campioni istologici e a seguito della valutazione di mutazioni somatiche si procede con la valutazione genetica (l'identificazione dei candidati alla consulenza genetica può essere formulato anche sulla base della storia personale e familiare del paziente), per identificare una dMMR costitutiva, con l'esclusione dei soggetti BRAF – mutati o MLH1 – ipermetilato. Evidenze sempre più forti hanno portato ad estendere la valutazione, in alcuni centri, alle donne con CE[43]. I criteri di sospetto clinico utilizzati per valutare se inviare il paziente direttamente a test genetico sono i criteri di Amsterdam o meno stringenti quelli di Bethesda[43]. Va precisato, che rimane molto importante il sospetto clinico, ma con la diffusione del test universale per la valutazione dell'instabilità dMMR su tessuto tumorale verranno identificati pazienti con un sospetto mirato su uno specifico gene. Nel caso di storia clinica e familiare sospetta,

molti laboratori preferiscono procedere direttamente con il NGS per questione relative ai costi e alla possibilità di indagare alterazioni a carico di altri geni[43].

Tabella 7. Algoritmo diagnostico dello screening universale della Sindrome di Lynch, Raccomandazioni AIOM – I tumori ereditari dello stomaco e del colon – retto/gennaio 2022 [43]:



Il test genetico si prefigge lo scopo di identificare VP responsabili di SL in famiglia, ma anche VUS da ricontrollare periodicamente e rivalutare (in circa il 5% dei casi vengono identificate), qualora fossero riclassificate come patogenetiche o meno. Il test genetico deve valutare, alla stregua di quanto avviene per BRCA1/2 sia mutazioni puntiformi, sia grandi riarrangiamenti (delezioni/duplicazioni). Il test “a cascata” sui famigliari non prevede di norma il pannello genico mediante NSG, ma analisi di una specifica sequenza, riscontrata mutata nel probando, al fine di identificare l’eventuale mutazione nel soggetto in esame. L’individuazione di VP nel soggetto avviene mediante diverse tecniche: tradizionale sequenziamento con Metodo Sanger per l’individuazione di specifici polimorfismi, MLPA per l’identificazione di ampi riarrangiamenti noti nei famigliari, pannelli multigenici con NGS, comprendenti geni per la LS e altre sindromi ereditarie (HBOC); infine, tecniche specifiche per l’ipermetilazione del promotore di MLH1.

2.1.16. Management dei pazienti affetti da Sindrome di Lynch:

- Sorveglianza clinico – strumentale[43]:
 1. Colonscopia con rimozione di eventuali formazioni poliposiche a partire dai 20 – 25 anni, da ripetere ogni 2 anni fino ai 40 anni e poi ogni 1 – 2 anni.
 2. Visita ginecologica annuale dai 25 anni (rischio aumentato CE e carcinoma ovarico).
 3. Citologia urinaria annuale dai 30 – 35 anni, in particolare in soggetti appartenenti a famiglie con casi tumore della pelvi renale e/o dell'uretere.
 4. Utile ecografia addominale annuale.
 5. Similmente, si potrebbe valutare una esofagogastroduodenoscopia dai 30 – 35 anni, ogni 2 – 4 anni ed eradicazione di H. Pylori.
 6. Può essere presa in considerazione una RM – addome o una colangio – RM annuale dai 50 anni nei soggetti con familiarità per neoplasia del pancreas.
- Profilassi chirurgica[43]:
 1. colectomia profilattica non consigliata.
 2. Istero – annessiectomia bilaterale possibile per la riduzione del rischio al termine dell'attività riproduttiva.
- Dati non conclusivi si hanno per la profilassi chemioterapica con basse dosi di acido – acetilsalicilico.

3. OBIETTIVI DELLO STUDIO:

Il presente studio sperimentale si pone l'obiettivo di valutare la prevalenza delle mutazioni germinali associate alla Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome e alla Sindrome di Lynch nei pazienti riferiti al Centro ad Alta Specializzazione di Riferimento Regionale di Genetica Oncologica “Prof. Riccardo Cellierino” dell'Università Politecnica delle Marche - AOU delle Marche. Lo studio si è posto i seguenti obiettivi:

- Identificare e valutare la prevalenza delle mutazioni riguardanti la linea germinale a carico dei geni per la Sindrome HBOC e Lynch, in pazienti selezionati e sottoposti a test genetico in relazione ai criteri definiti presso il Centro di riferimento Regionale di Genetica Oncologica.

- Identificare la mediana dell'età dei soggetti sottoposti a test genetico e la mediana dell'età alla prima diagnosi oncologica e si è poi utilizzato il Test di d'Agostino – Pearson per definire la normalità o meno delle distribuzioni dei dati.
- Confrontare mediante Test di Mann – Whitney la mediana dell'età alla prima diagnosi oncologica in relazione alla diagnosi di tumore singolo o di tumori multipli.
- Confrontare mediante Test di Mann – Whitney la mediana dell'età alla prima diagnosi oncologica in relazione alla presenza per mutazioni associabile alla Sindrome di Lynch, a Sindrome HBOC o ad altra mutazione.
- Confrontare mediante Test del Chi – quadro l'esito del test (VP, VP + VUS, VUS, “non informativo”) nei pazienti suddivisi in tre gruppi in relazione all'ereditarietà per la Sindrome HBOC.
- Confrontare mediante Test del Chi – quadro l'esito del test (VP, VP + VUS, VUS, “non informativo”) nei pazienti suddivisi in tre gruppi in relazione all'ereditarietà per la Sindrome di Lynch.

4. PAZIENTI E METODI UTILIZZATI:

4.1.1. Criteri di inclusione nello studio:

Il presente studio si inserisce in una linea di ricerca già avviata presso il Centro di riferimento Regionale di Genetica Oncologica ed ha arruolato pazienti per counselling genetico, nel periodo compreso tra il 03/01/2023 e il 03/11/2023. I pazienti riferiti al centro avevano già affrontato un percorso completo di CGO comprendente consulenza pre-test, test genetico e consulenza genetica post-test. I pazienti sono stati selezionati in base alla loro familiarità che potesse suggerire la presenza di mutazioni germinali a carico dei geni BRCA1/2 e Sindrome di Lynch. I criteri utilizzati per la selezione dei pazienti, sono quelli precedentemente riportati per la Sindrome HBOC e per la Sindrome di Lynch (Sindrome HBOC: Linee guida SINDROMI DI PREDISPOSIZIONE EREDITARIA AI TUMORI: Tumori associati ai geni della ricombinazione omologa, AIOM, 2025[39]. Sindrome di Lynch: Raccomandazioni per l'implementazione del test universale su carcinomi colorettali ed endometriali per l'identificazione della Sindrome di LYNCH, AIOM, 2022[48]).

Le cartelle cliniche utilizzate per la raccolta dei dati sono archiviate presso il Centro ad Alta Specializzazione di Riferimento Regionale di Genetica Oncologica. Ciascun paziente ha firmato un consenso informato ed è stata garantita la riservatezza dei dati personali secondo la normativa di legge vigente in materia di trattamento di dati genetici altamente sensibili.

4.1.2. Analisi statistica e detection rate:

Nel presente studio sono state analizzate tutte le mutazioni riscontrate nel campione in esame, fra loro distinte per tipologia, varianti patogenetiche e non patogenetiche. Il nostro studio ha raccolto tutti i dati correlati all'ereditarietà, all'età, all'insorgenza di secondi tumori. Lo studio ha voluto indagare la distribuzione dell'età dei soggetti sottoposti a test genetico, l'età alla prima diagnosi di tumore., la molteplicità del tumore. L'età è stata messa in correlazione con la diagnosi di tumori multipli e non, alle mutazioni genetiche riscontrate. L'esito del test genetico è stato correlato con l'ereditarietà sia per la Sindrome di Lynch, che per l'HBOC. Il test di d'Agostino – Pearson è stato utilizzato per valutare la normalità delle distribuzioni dei dati. Per valutare la differenza tra variabili categoriali è stato usato il test del Chi – quadro, mentre per valutare la differenza tra le distribuzioni di variabili continue è stato utilizzato il Test di Mann – Whitney. Il livello di significatività statistica per le varie analisi è stato posto a 0.05. Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il programma MedCalc Statistical Software version 19.7.2 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium). <https://www.medcalc.org>; 2021.

Il Detection Rate (DR) rappresenta la probabilità di riscontro di una VP nei pazienti con diagnosi di cancro mammario/ovarico, in relazione o meno alla presenza di ereditarietà per HBOC. Il DR è stato calcolato come segue:

$$DR \text{ ereditarietà HBOC} = \frac{n. \text{ di pazienti con VP con ereditarietà HBOC}}{n. \text{ pazienti con ereditarietà HBOC}}$$

$$DR \text{ senza ereditarietà HBOC} = \frac{n. \text{ di pazienti con VP senza ereditarietà HBOC}}{n. \text{ pazienti senza ereditarietà HBOC}}$$

$$DR \text{ ereditarietà Lynch} = \frac{n. \text{ di pazienti con VP con ereditarietà Lynch}}{n. \text{ pazienti con ereditarietà Lynch}}$$

$$DR \text{ senza ereditarietà Lynch} = \frac{n. \text{ di pazienti con VP senza ereditarietà Lynch}}{n. \text{ pazienti senza ereditarietà Lynch}}$$

4.1.3. Next Generation Sequencing (NGS):

Il Sequenziamento di Nuova Generazione affonda le sue radici nell'invenzione della PCR (Polymerase Chain Reaction) da parte di K. Mullis. La PCR è una tecnica di biologia molecolare che permette l'amplificazione di piccoli frammenti di DNA. I principi fondamentali della procedura sono i seguenti[83][84]: si procede con il designing dei primers, cioè la definizione di sequenze di oligonucleotide complementare alle sequenze fiancheggianti la regione da amplificare. Ogni frammento di DNA presenterà la doppia elica unita da ponti ad idrogeno, con sequenze complementari fra loro, tali sequenze ne presentano altre fiancheggianti, che vengono utilizzate per legare due piccoli inneschi, i primers, definiti Forward (lega il filamento template, orientato 3' – 5', in cui la Polimerasi aggiunge nucleotidi velocemente e in continuo) e Reverse (lega la sequenza orientata 5' – 3', caratterizzata dall'aggiunta lenta di nucleotidi, discontinui, i Frammenti di Okazaki). I primers presentano una lunghezza di circa 15 – 30 nucleotidi, con un contenuto di G – C pari al 40 – 60% e specifica temperatura di melting, cioè di legame. I primers sono quindi l'innescio per l'attività di amplificazione della polimerasi. Nei protocolli di base si utilizzano piastre con 96 pozzetti all'interno delle quali vengono posti i reagenti, precedentemente conservati a freddo per evitare attività esonucleasica non prevista (fra i reagenti di fondamentale importanza abbiamo il tampone (buffer salino), acqua sterile, dNTPs, Primers e DNA template). L'attività polimerasica è svolta da una DNA polimerasi batterica, la Taq, originariamente estratta dal *Thermus Aquaticus*, resistente ad alte temperature. La Taq viene correttamente miscelata ai reagenti e il tutto viene poi inserito in un termociclatore, che permette variazioni di temperatura automatizzate. Il primo step consta della denaturazione del DNA così da separare le due eliche, ad una temperatura appositamente settata in relazione a caratteristiche enzimatiche e del campione (in genere tra i 94 e i 98°C). Terminata la prima fase di denaturazione si hanno 3 differenti fasi ripetute fino a 35 volte al fine di ottenere un'amplificazione corretta di sequenze selezionate: denaturazione, con riottenimento di filamenti separati ad ogni ciclo, Annealing, caratterizzata dal legame dei primers alla temperatura di melting dei primers e infine la fase di elongazione, con attivazione ottimale della processività della Taq (temperatura ottimale fra 70 e 80°C). Temperatura e durata di ogni step sono decise dall'operatore al fine di massimizzare l'attività di replicazione. Infine, si ha una fase di alcuni minuti di allungamento, a temperatura ottimale, che permette il completamento delle catene incomplete. Ogni ciclo permette la duplicazione dei template preesistenti, con una resa teorica esponenziale data dalla formula:

$$R = 2^n \cdot y$$

Con $y = n$. di copie iniziale di DNA e n il numero di cicli. Al termine della PCR i prodotti amplificati possono essere visualizzati su gel di agarosio dopo corsa elettroforetica.

Il sequenziamento del DNA mediante metodo Sanger è stato il più utilizzato per anni: la PCR è caratterizzata dall'aggiunta di ddNTPs, desossiribonucleotidi modificati mancanti del gruppo ossidrilico al 3', in modo da interrompere la sintesi del DNA[85]. Alla PCR segue corsa elettroforetica e determinazione della sequenza di DNA in relazione ai pesi molecolari dei singoli ampliconi ottenuti. Il Sequenziamento Sanger è stato progressivamente soppiantato nella pratica routinaria dal NGS (Next Generation Sequencing). La rivoluzione apportata dall'NGS è correlata alla riduzione dei costi, dei tempi e contestualmente all'aumento delle copie ottenute mediante sequenziamento, il che permette un'applicazione semplificata dell'analisi del genoma alla pratica clinica. Il Massively Parallel Sequencing (MPS) o NGS ha permesso di ottenere risultati ad un costo inferiore rispetto al metodo Sanger, per esempio il costo di un Mb di dati è stato stimato a 6 dollari con la tecnologia Illumina[82], nonché i tempi risultano notevolmente accorciati, un numero maggiore di mutazioni su linea germinale o somatica vengono identificate con il NGS, grazie a migliaia di reazioni di sequenziamento in parallelo, l'attività di amplificazione è automatizzata dallo strumento. Un'ulteriore punto a favore è la capacità di identificare anche mutazioni in alleli minori con un'accuratezza elevata, il che definisce una nuova frontiera nell'identificazione di mutazioni rare a livello tumorale. Una delle grosse problematiche dell'NGS è la produzione di reads comprese fra 30 e 400 bp, il che lo rende problematico nel sequenziamento di genomi sconosciuti, ma l'applicazione di tecniche paired and mate – end, cioè di doppia lettura della sequenza da entrambe i terminali ha permesso di amplificare tali sequenze da 30 – 400 bp a 5 – 10kB, risolvendo il problema e permettendo il sequenziamento di grandi varianti nel genoma umano, superiori a 3kB. La tecnologia NGS, congiuntamente al metodo Sanger rappresentano le metodiche più utilizzate, con la possibilità, in caso si evidenzino grandi delezioni o inserzioni dei geni analizzati, è possibile utilizzare la tecnica MLPA (Multiple Ligation Probe Amplification), maggiormente adatta per i grandi riarrangiamenti. I sistemi di NGS sono maggiormente prone all'errore, con un tasso compreso fra l'0,1 e l'1%, a differenza del metodo Sanger, che presenta un tasso di errore di 1/1000. Tale metodo, seppur il NGS sia molto più vantaggioso in termini di tempo ed risparmio economico rappresenta ancora il Gold standard nella conferma dei risultati precedentemente ottenuti mediante NGS[79][81].

4.1.4. NGS e Ion Torrent Technology:

La tecnologia Ion Torrent rappresenta una delle possibili tecniche di sequenziamento di nuova generazione ed è attualmente utilizzata nel laboratorio del Centro di Riferimento Regionale di Genetica Oncologica. La piattaforma in questione (Ion Chef/Ion S5) è un sequenziatore da bancone, con capacità di processazione molto più limitate rispetto ad altre strumentazioni, ma con l'intento di essere applicato a sequenziamenti in cui la quantità di basi è limitata e l'intento principale è quello di rendere più economica l'analisi. Gli steps operativi sono i seguenti:

- Preparazione della libreria di frammenti di DNA, con tecnologia Ampli- Seq; (Ion Chef).
- Amplificazione clonale dei frammenti (Ion Chef).
- Sequenziamento (Ion S5).
- Analisi bioinformatica dei dati ottenuti.

Il processo di sequenziamento è caratterizzato da due aspetti essenziali:

1. L'utilizzo di semiconduttori che fungono da elemento strutturale, cioè supporti in cui viene dispensato il campione per il sequenziamento (Ion Chips).
2. L'impiego di un sistema di rilevamento che non si basa su reazioni luminescenti, ma su variazioni di potenziale.

Il fulcro centrale del sequenziamento è l'Ion Chip, un supporto caratterizzato da uno strato superiore costituito da pozzetti che possono accogliere beads e reagenti per il sequenziamento, ciascuno contenente una sola biglia. Il secondo strato, su cui poggia il primo, è caratterizzato da semiconduttori utili per la trasmissione del segnale. Questo secondo strato è una piastra di sensori che rilevano piccole variazioni di pH trasformandole in ddP. Il sequenziamento è un susseguirsi di lavaggi e flussi di soluzioni che contengono uno dei quattro nucleotidi. Ciascun nucleotide viene incorporato con formazione di un legame fosfodiesterico su frammenti tutti uguali di DNA ancorati alle singole beads. Una volta incorporato il nucleotide e formato il legame si ha l'idrolisi del gruppo trifosfato e la liberazione di protoni, con variazione del pH e rilevazione da parte dei sensori. La variazione trasmessa viene digitalizzata dalla macchina in maniera proporzionale al numero delle basi incorporate. Nelle zone omopolimeriche l'intensità della variazione del ddP è proporzionale al quantitativo di base identiche consecutive. Il ciclo viene ripetuto per 500 volte, con sequenziamento di reads lunghe 200 bp[79][80].

5. RISULTATI:

5.1.1. Analisi di tutta la popolazione che ha svolto il test genetico:

Dei 538 pazienti sottoposti a test genetico abbiamo ottenuto i seguenti risultati:

- 330 (61,3%) soggetti testati hanno ottenuto un risultato “non informativo”.
- 71 (13,2%) soggetti testati hanno ottenuto un risultato “positivo”, di questi 18 presentavano, congiuntamente ad una VP anche una VUS.
- 137 (25,5%) soggetti testati presentava una variante a significato incerto.

Dall’analisi delle varianti patogenetiche (71 pazienti), 34 pazienti (47,9%) presentavano una variante patogenetica dei geni BRCA, nello specifico è emerso che 13 pazienti (18,3%) presentava una variante patogenetica di BRCA1, 20 pazienti (28,2%) presentava una variante patogenetica di BRCA2 e 1 paziente (1,4%) presentava sia una variante si BRCA1, sia di BRCA2. 16 pazienti (22,5%) presentavano una variante patogenetica predisponente alla Sindrome di Lynch, nello specifico 6 (8,5%) MSH2, 7 (9,8%) MSH6, 3 (4,2%) PMS2. 21 (29,6%) pazienti presentavano varianti patogenetiche su altri geni presi in esame con il pannello multigenico.

DR (ereditarietà HBOC) = $11/30 = 36,7\%$

DR (non ereditarietà HBOC) = $60/508 = 11,8\%$

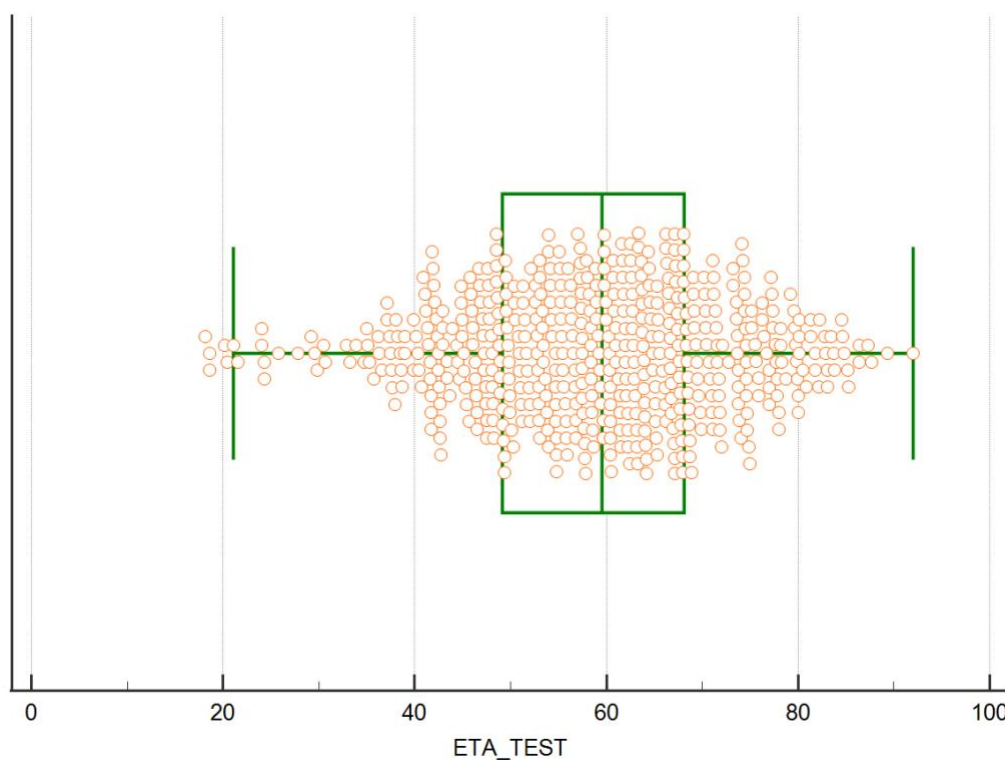
DR (ereditarietà Lynch) = $6/17 = 35,3\%$

DR (non ereditarietà Lynch) = $65/521 = 12,5\%$

5.1.2. Distribuzione dell’età all’esecuzione del test genetico:

La mediana dell’età nei 538 pazienti sottoposti a test genetico è risultata essere 60 anni (range 18 - 92 anni). L’intervallo interquartile di distribuzione dei dati ha un valore compreso tra 49 anni (Q1) e 68 anni (Q3) (Boxplot 1). È stato utilizzato il test di d’Agostino – Pearson per valutare la normalità o meno della distribuzione dei dati.

- Il Coefficiente di asimmetria dei dati “Skewness” della distribuzione dei dati è pari a -0.2989 , con $p = 0.0051$, statisticamente significativa.
- Il Coefficiente di curtosi “Kurtosis” della distribuzione dei dati è pari a -0.07649 , con $p = 0.7764$, statisticamente non significativo.

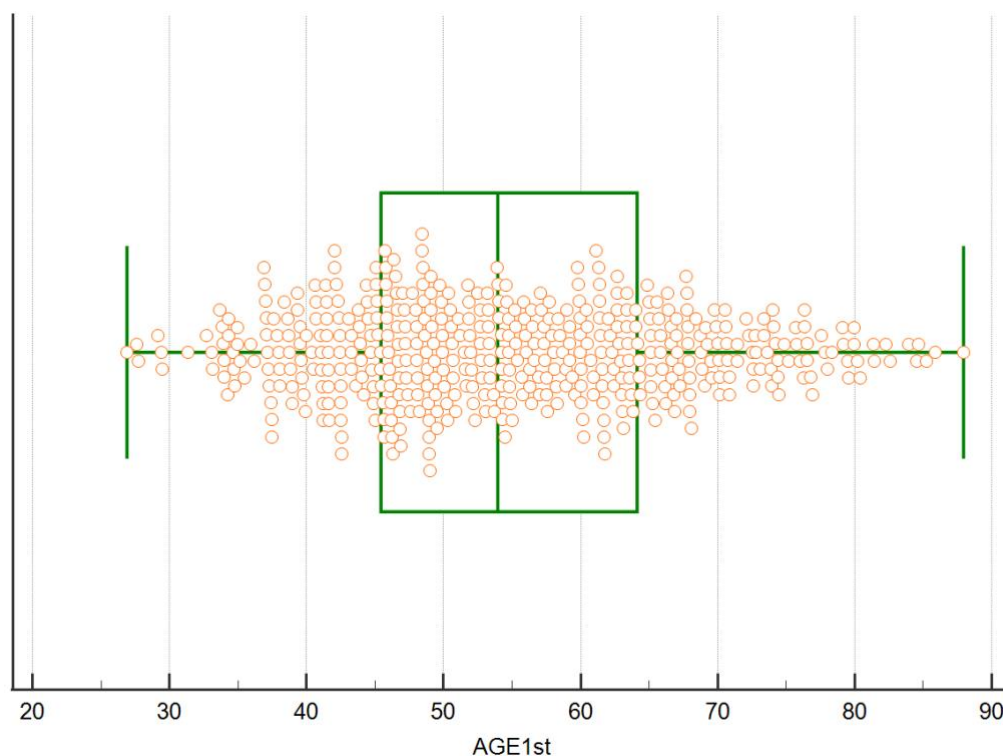


Boxplot 1. Distribuzione dell'età dei pazienti sottoposti a test genetico.

5.1.3. Distribuzione dell'età dei soggetti sottoposti a test genetico alla prima diagnosi oncologica:

La mediana dell'età alla prima diagnosi oncologica nei 475 pazienti sottoposti a test genetico e positivi per neoplasia è risultata essere 54 anni, (range 27 - 88 anni). L'intervallo interquartile di distribuzione dei dati ha un valore compreso tra 45 anni (Q1) e 64 anni (Q3) (Boxplot 2). È stato utilizzato il test di d'Agostino – Pearson per valutare la normalità o meno della distribuzione dei dati.

- Il Coefficiente di asimmetria dei dati, “skewness” della distribuzione dei dati è pari a 0.2453, con $p = 0.0294$, statisticamente significativa.
- Il Coefficiente di curtosi dei dati, “kurtosis” della distribuzione dei dati è pari a -0.6263 , con $p < 0.0001$, statisticamente significativo.



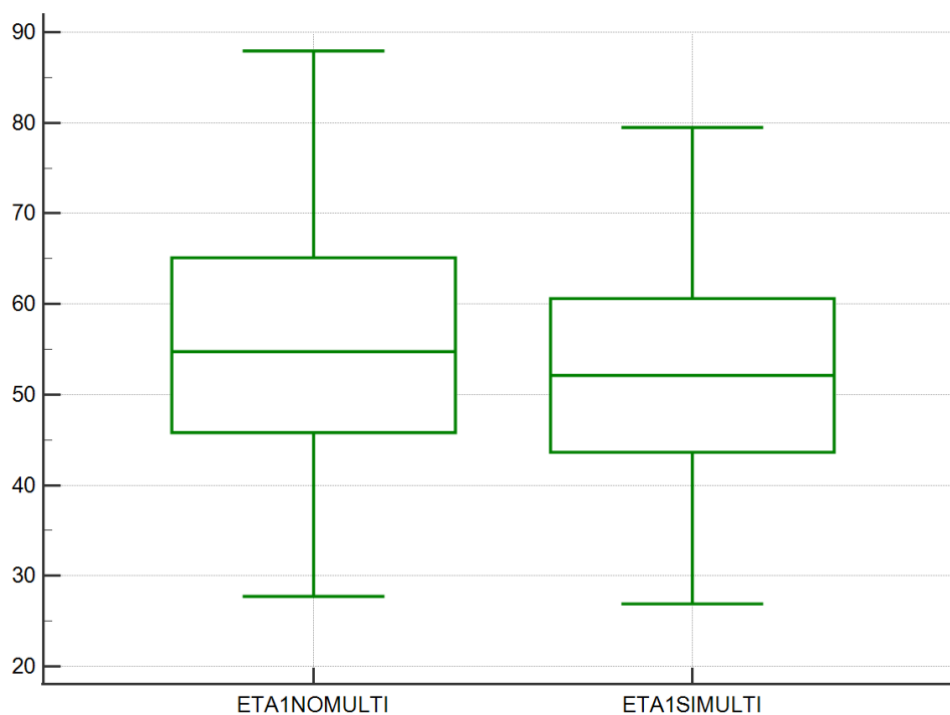
Boxplot 2. Distribuzione dell'età dei pazienti sottoposti a test genetico alla prima diagnosi di tumore.

5.1.4. Confronto della mediana dell'età alla prima diagnosi oncologica tra pazienti con diagnosi singola di neoplasia e pazienti con diagnosi multipla di neoplasia:

Il test di Mann – Whitney è stato utilizzato per confrontare la mediana dell'età dei pazienti alla prima diagnosi oncologica sottoposti a test genetico, tra pazienti con diagnosi singola o multipla di neoplasia (Boxplot 3).

- Nei 475 pazienti sottoposti a test genetico con diagnosi di tumore, la mediana dell'età alla prima diagnosi oncologica è risultata 55 nei soggetti (362 pazienti) con diagnosi singola di neoplasia. L'IC al 95% per la mediana dell'età nei soggetti con singola neoplasia è risultato essere compreso tra 52 anni e 57 anni. L'intervallo interquartile della distribuzione è risultato essere compreso tra 46 anni (Q1) e 65 anni (Q3).
- La mediana dell'età alla prima diagnosi oncologica è risultata 52 nei soggetti (113 pazienti) con diagnosi multipla di neoplasia. L'IC al 95% per la mediana dell'età nei soggetti con neoplasia multipla è risultato essere compreso tra 48 anni e 54 anni. L'intervallo interquartile della distribuzione è risultato essere compreso tra 44 anni (Q1) e 61 anni (Q3).

Il test ha evidenziato una differenza statisticamente significativa ($p = 0.0404$)



Boxplot 3. Mediana età dei pazienti sottoposti a test genetico alla prima diagnosi di tumore con diagnosi di neoplasia singola e multipla.

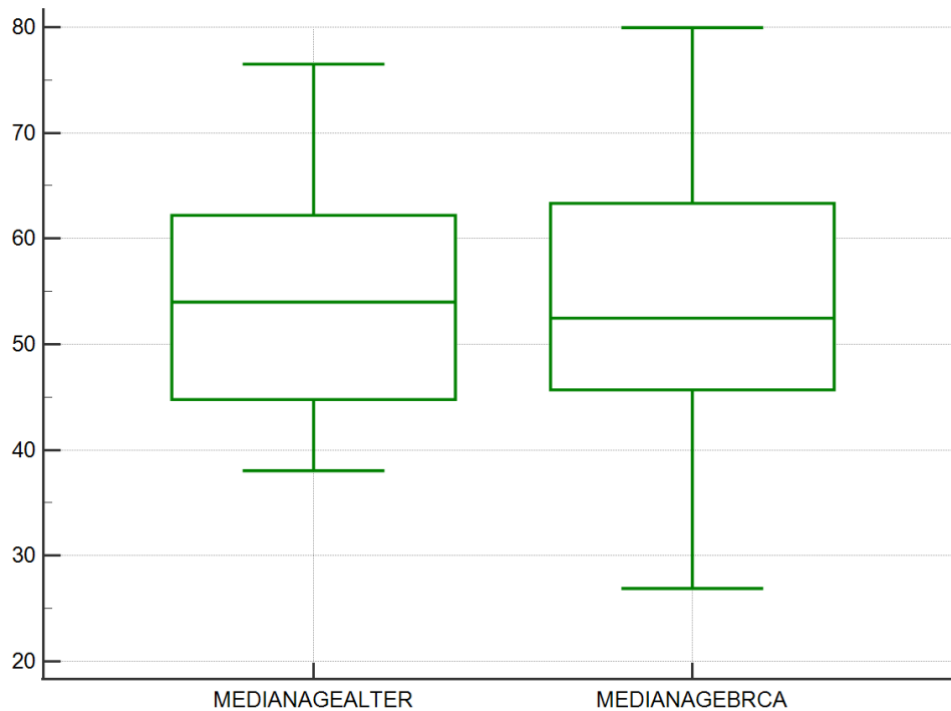
5.1.5. Confronto della mediana dell'età alla prima diagnosi oncologica tra pazienti con mutazioni dei geni BRCA e mediana dell'età alla prima diagnosi di tumore con mutazione di altri geni:

Il test di Mann – Whitney è stato utilizzato per confrontare la mediana dell'età dei pazienti alla prima diagnosi oncologica con test positivo per mutazione di geni differenti dai geni BRCA e non correlati a Sindrome di Lynch e positivo per mutazione dei geni BRCA (Boxplot 4).

- Nei 20 pazienti con diagnosi di neoplasia e test positivo per mutazioni di geni non BRCA e non associati a Sindrome di Lynch, la mediana dell'età alla prima diagnosi oncologica è risultata 54 anni. L'IC al 95% per la mediana dell'età alla prima diagnosi è risultato essere compreso fra 45 anni e 59 anni. L'intervallo interquartile è risultato essere compreso fra 45 anni (Q1) e 62 anni (Q3).
- Nei 27 pazienti con diagnosi di neoplasia e test positivo per mutazioni dei geni BRCA, la mediana dell'età alla prima diagnosi oncologica è risultata 52 anni. L'IC al 95% per la

mediana dell'età è risultato essere compreso fra 50 anni e 63 anni. L'intervallo interquartile è risultato essere compreso fra 46 anni (Q1) e 63 anni (Q3).

Il test non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa ($p = 0,6985$).



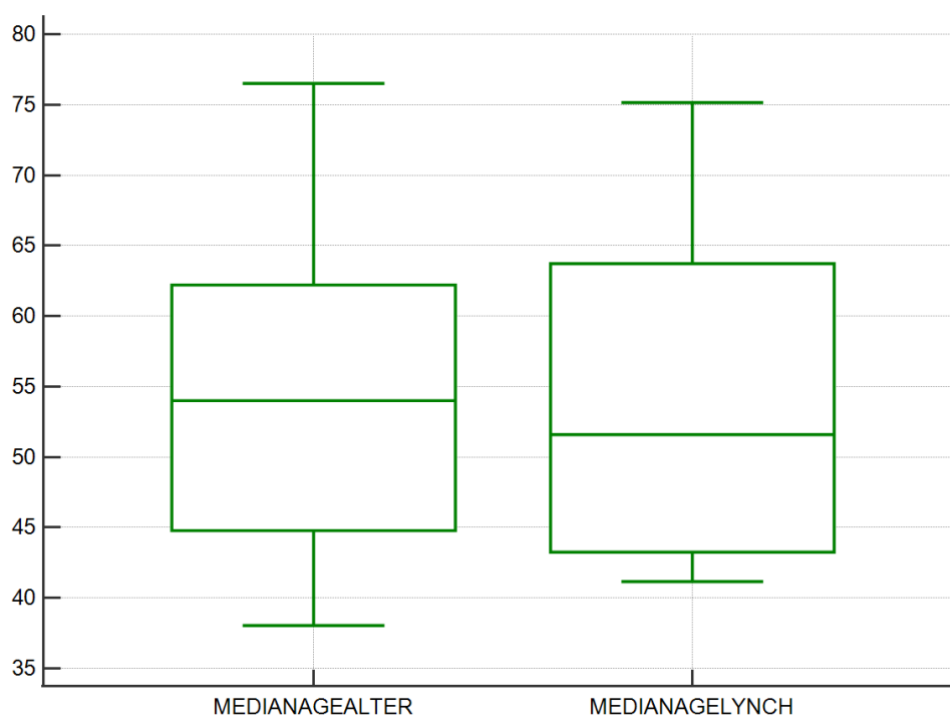
Boxplot 4. Mediana dell'età alla prima diagnosi di tumore in pazienti con mutazione di geni non BRCA e non correlati alla Sindrome di Lynch e mediana età alla prima diagnosi di tumore in pazienti con mutazione dei geni BRCA

5.1.6. Confronto della mediana dell'età alla prima diagnosi oncologica tra pazienti con mutazioni di geni non BRCA e non correlati alla Sindrome di Lynch e mediana dell'età alla prima diagnosi di tumore con mutazione di geni correlati alla Sindrome di Lynch:

Il test di Mann – Whitney è stato utilizzato per confrontare la mediana dell'età dei pazienti alla prima diagnosi oncologica con test positivo per mutazione di geni non BRCA e non appartenenti a geni associati alla Sindrome di Lynch e la mediana dell'età dei pazienti alla prima diagnosi con test positivo per mutazione appartenente a geni associati a Sindrome di Lynch (Boxplot 5).

- Nei 20 pazienti con diagnosi di neoplasia e test positivo per mutazioni di geni non BRCA e non associati alla Sindrome di Lynch, la mediana dell'età alla prima diagnosi oncologica è risultata 54 anni. L'IC al 95% per la mediana dell'età alla prima diagnosi è risultato essere compreso fra 45 anni e 59 anni. L'intervallo interquartile è risultato essere compreso fra 45 anni (Q1) e 62 anni (Q3).
- Nei 14 pazienti con diagnosi di neoplasia e test positivo per mutazioni di geni associati alla Sindrome di Lynch, la mediana dell'età alla prima diagnosi oncologica è risultata 52 anni. L'IC al 95% per la mediana dell'età alla prima diagnosi in tali pazienti è risultato essere compreso fra 43 anni e 64 anni. L'intervallo interquartile è risultato essere compreso fra 43 anni (Q1) e 64 anni (Q3).

Il test non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa ($p = 1,0$)



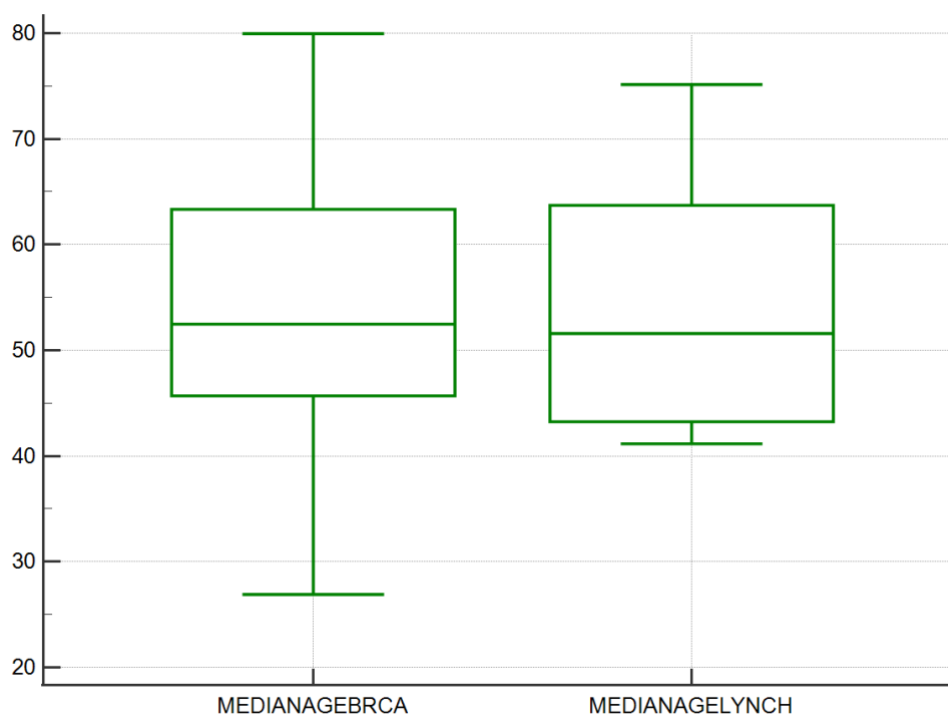
Boxplot 5. Mediana dell'età alla prima diagnosi di tumore in pazienti con mutazione di geni non BRCA e non correlati alla Sindrome di Lynch e mediana dell'età alla prima diagnosi di tumore con mutazione di geni correlati alla Sindrome di Lynch.

5.1.7. Confronto della mediana dell'età alla prima diagnosi oncologica tra pazienti con mutazioni di geni correlati alla Sindrome HBOC e mediana dell'età alla prima diagnosi di tumore con mutazione di geni correlati alla Sindrome di Lynch.:

Il test di Mann – Whitney è stato utilizzato per confrontare la mediana dell'età dei pazienti alla prima diagnosi oncologica con test positivo per mutazione dei geni BRCA e positivo per mutazione appartenente a geni associati a Sindrome di Lynch (Boxplot 6).

- Nei 27 pazienti con diagnosi di neoplasia e test positivo per mutazioni dei geni BRCA, la mediana dell'età alla prima diagnosi oncologica è risultata 52 anni. L'IC al 95% per la mediana dell'età è risultato essere compreso fra 50 anni e 63 anni. L'intervallo interquartile è risultato essere compreso fra 46 anni (Q1) e 63 anni (Q3).
- Nei 14 pazienti con diagnosi di neoplasia e test positivo per mutazioni di geni associati alla Sindrome di Lynch la mediana dell'età alla prima diagnosi oncologica è risultata 52 anni. L'IC al 95% per la mediana dell'età è risultato essere compreso fra 43 anni e 64 anni. L'intervallo interquartile è risultato essere compreso fra 43 anni (Q1) e 64 anni (Q3).

Il test non ha evidenziato una differenza statisticamente significativa ($p = 0,7834$).



Boxplot 6. Mediana età alla prima diagnosi di tumore con mutazione dei geni BRCA e mediana dell'età alla prima diagnosi di tumore con mutazione di geni correlati alla Sindrome di Lynch.

5.1.8. Risultato del test genetico in relazione all'ereditarietà per HBOC:

Dei 538 pazienti analizzati, 508 (94,4%) non presentavano ereditarietà in famiglia per HBOC, 19 (3,5%) presentavano ereditarietà correlata a un familiare di primo grado e 11 (2,0%) presentavano ereditarietà correlata a familiare di grado superiore al primo.

- Dei 508 pazienti che non presentavano ereditarietà per HBOC, 311 (61,2%) hanno ricevuto test “non informativo”, 44 (8,7%) hanno ricevuto un test “positivo” per VP, 16 (3,1%) hanno ricevuto un risultato “positivo” per VP + VUS e 137 (27%) hanno ricevuto un risultato del test “dubbio” con VUS rilevata.
- Dei 19 pazienti che presentavano un'ereditarietà correlata ad un familiare di primo grado, 11 (57,9%) hanno ricevuto un test “non informativo”, 7 (36,8%) hanno ricevuto un risultato “positivo” per VP, 1 (5,3%) ha ricevuto un test “positivo” per VP + VUS e infine 0 pazienti hanno ricevuto un test “dubbio”.

- Degli 11 pazienti che presentavano un'ereditarietà correlata a familiare di grado superiore al primo, 8 (72,7%) hanno ricevuto un test “non informativo”, 2 (18,2%) hanno ricevuto un risultato “positivo” per VP, 1 (9,1%) ha ricevuto un risultato “positivo” per VP + VUS e infine 0 pazienti hanno ricevuto un test “dubbio”.

Per mettere in relazione il risultato del test genetico con l'ereditarietà per HBOC (assenza di ereditarietà, ereditarietà correlata a familiare di primo grado, ereditarietà correlata a familiare di grado superiore al primo) è stato utilizzato il test del Chi – quadro.

Il test ha evidenziato significatività statistica ($p = 0,0003$).

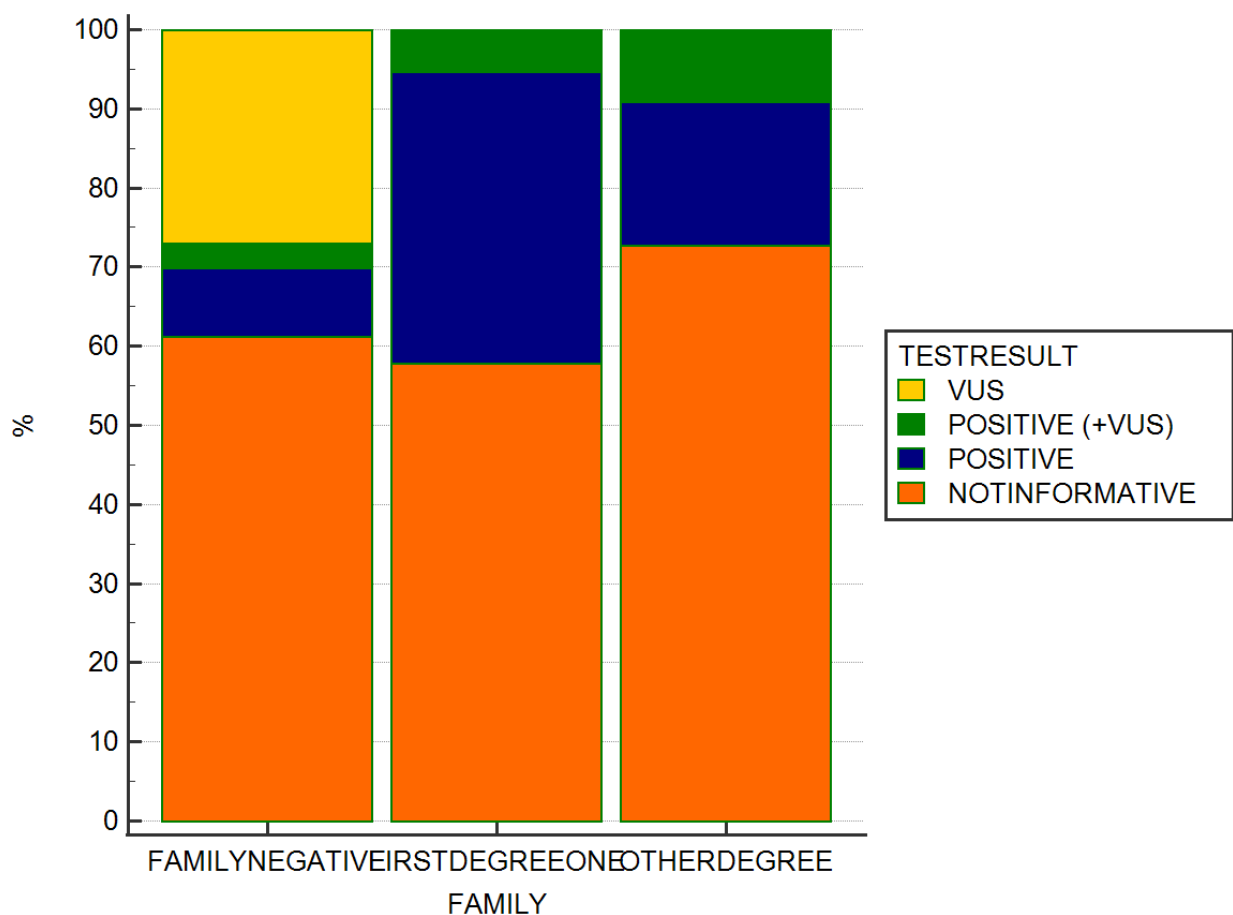


Grafico 1. Diagramma a barre che mette in relazione l'ereditarietà per HBOC con il risultato del test genetico.

5.1.9. Risultato del test genetico in relazione all'ereditarietà per Sindrome di Lynch:

Dei 538 pazienti analizzati, 521 (96,8%) non presentavano ereditarietà in famiglia per la Sindrome di Lynch, 15 (2,8%) presentavano ereditarietà correlata ad un familiare di primo grado e 2 (0,4%) presentavano ereditarietà correlata a familiare di grado superiore al primo.

- Dei 521 pazienti che non presentavano ereditarietà per la Sindrome di Lynch, 321 (61,6%) hanno ricevuto test “non informativo”, 47 (9%) hanno ricevuto un test “positivo” per VP, 18 (3,5%) hanno ricevuto un risultato “positivo” per VP + VUS e 135 (25,9%) hanno ricevuto un risultato del test “dubbio” con VUS rilevata.
- Dei 15 pazienti che presentavano un'ereditarietà correlata ad un familiare di primo grado, 7 (46,7%) hanno ricevuto un test “non informativo”, 6 (40%) hanno ricevuto un risultato “positivo” per VP, 0 hanno ricevuto un test “positivo” per VP + VUS e infine 2 (13,3%) pazienti hanno ricevuto un test “dubbio” con VUS rilevata.
- Dei 2 pazienti che presentavano un'ereditarietà correlata a familiare di grado superiore al primo, 2 (100%) hanno ricevuto un test “non informativo”, 0 hanno ricevuto un risultato “positivo” per VP, 0 hanno ricevuto un risultato “positivo” per VP + VUS e infine 0 pazienti hanno ricevuto un test “dubbio” con VUS rilevata.

Per mettere in relazione il risultato del test genetico con l'ereditarietà per la Sindrome di Lynch (assenza di ereditarietà, ereditarietà correlata a familiare di primo grado, ereditarietà correlata a familiare di grado superiore al primo) è stato utilizzato il test del Chi – quadro.

Il test ha evidenziato significatività statistica ($p = 0,0078$).

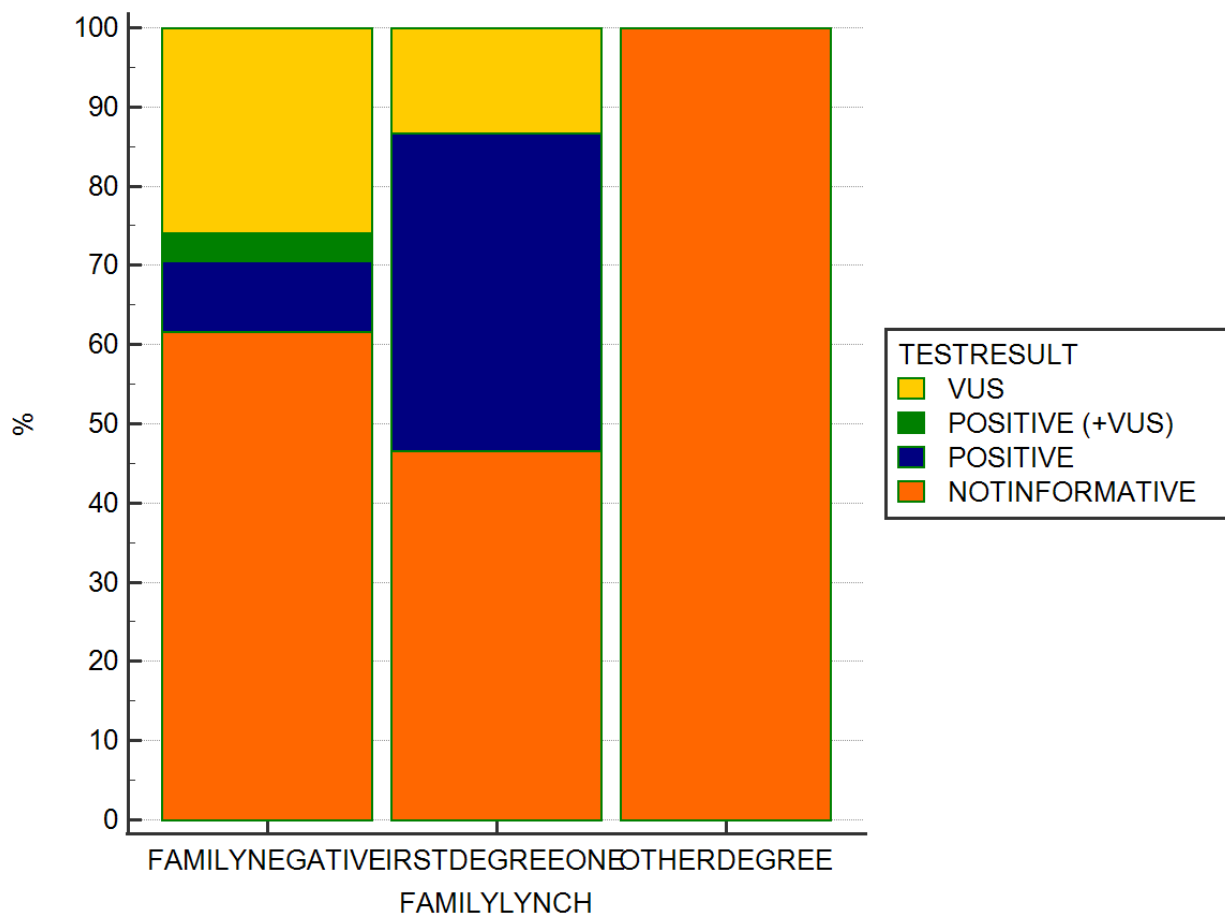


Grafico 2. Diagramma a barre che metta in relazione l’ereditarietà per la Sindrome di Lynch con il risultato del test genetico.

5.1.10. Prevalenza di tumori multipli in relazione alla mutazione genetica rilevata:

Per mettere in relazione la prevalenza di tumori multipli, con le diverse mutazioni rilevate dal test genetico, suddivise in 4 categorie: “altre”, cioè mutazioni non BRCA, né correlate a Sindrome di Lynch, mutazioni di BRCA, mutazione BRCA + “altre” e infine mutazioni correlate a Sindrome Lynch, è stato utilizzato il test del Chi – quadro.

- Dei 20 pazienti con mutazioni su altri geni, non BRCA o correlati alla Sindrome di Lynch e diagnosi di tumore, 14 (70%) non presentavano diagnosi di tumori multipli, 6 (30%) presentavano diagnosi di tumori multipli.

- Dei 27 pazienti con mutazioni sui geni BRCA e diagnosi di tumore, 19 (70%) non presentavano diagnosi di tumori multipli, 8 pazienti (30%) presentavano diagnosi di tumori multipli.
- Un solo paziente, nel nostro studio presentava positività del test per dei geni BRCA e mutazione su geni non BRCA, né correlato a sindrome di Lynch. Il paziente non presentava diagnosi di tumori multipli.
- Dei 14 pazienti con mutazioni sui geni correlati alla Sindrome di Lynch e diagnosi di tumore, 10 (71,4%) non presentavano diagnosi di tumori multipli, 4 (28,6%) presentavano diagnosi di tumori multipli.

Il test non ha evidenziato significatività statistica ($p = 0,082$).

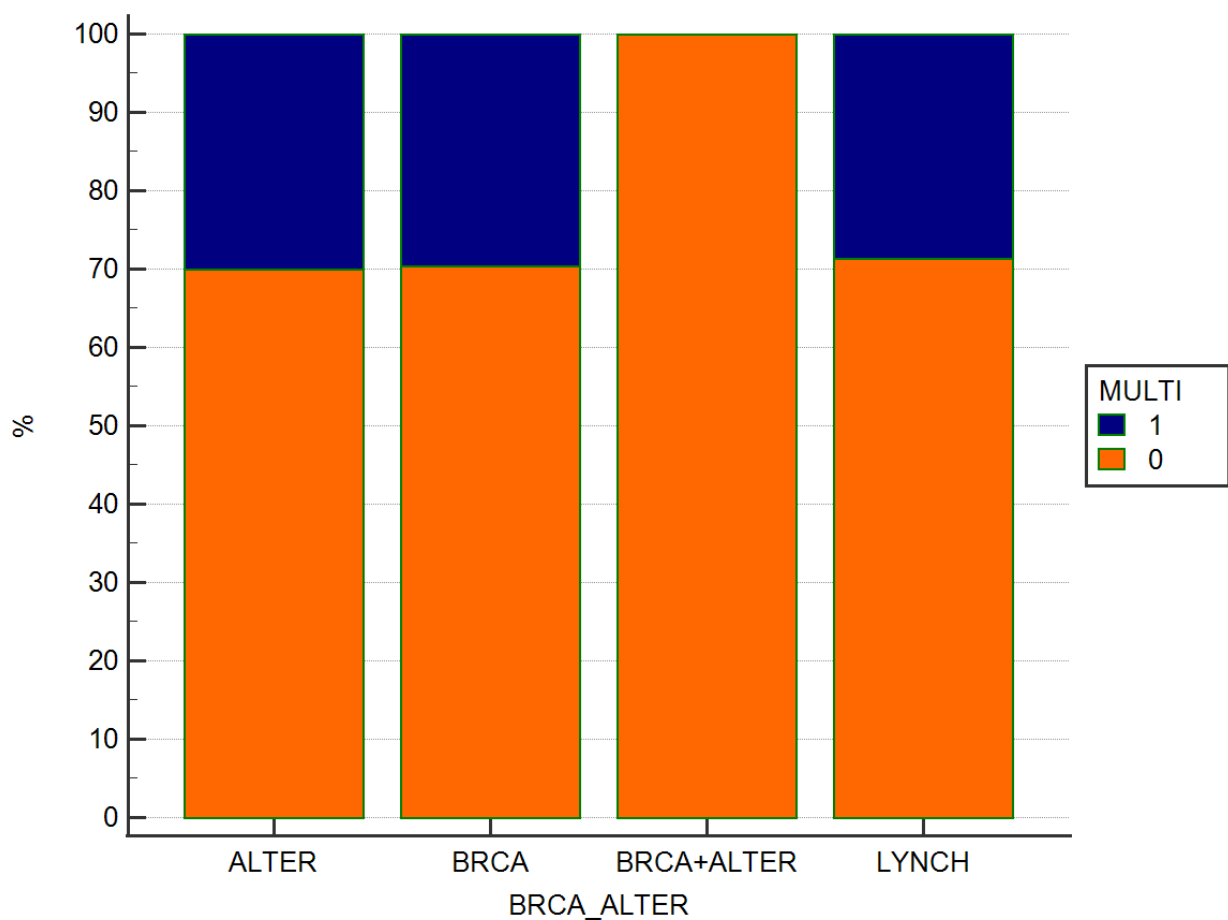


Grafico 3. Diagramma a barre che metta in relazione la presenza di mutazioni germinali con la prevalenza di tumori multipli.

5.1.11. Prevalenza nei pazienti testati del tumore mammario come prima diagnosi di neoplasia in relazione alla mutazione genetica rilevata:

Per mettere in relazione la prevalenza del tumore alla mammella come prima diagnosi di neoplasia, con le diverse mutazioni rilevate dal test genetico, suddivise in 4 categorie: “altre”, cioè mutazioni non BRCA, né correlate a Sindrome di Lynch, mutazioni di BRCA, mutazione BRCA + “altre” e infine mutazioni correlate a Sindrome Lynch, è stato utilizzato il test del Chi – quadro.

- Dei 20 pazienti con mutazioni su altri geni, non BRCA, né correlati alla Sindrome di Lynch e diagnosi di tumore, 11 (55%) presentavano un tumore mammario come prima diagnosi di neoplasia, 9 (45%) presentavano altra neoplasia come prima diagnosi di tumore.
- Dei 27 pazienti con mutazioni su geni BRCA e diagnosi di tumore, 17 (63%) presentavano un tumore mammario come prima diagnosi di neoplasia, 10 pazienti (37%) presentavano altra neoplasia come prima diagnosi di tumore.
- Un solo paziente, nel nostro studio presentava positività del test per mutazione dei geni BRCA e mutazione su gene non BRCA, né correlato a sindrome di Lynch. Il paziente presentava diagnosi di tumore alla mammella come prima diagnosi di tumore.
- Dei 14 pazienti con mutazioni sui geni correlati alla Sindrome di Lynch e diagnosi di tumore, 4 (28,6%) presentavano un tumore mammario come prima diagnosi di neoplasia, 10 (71,4%) presentavano altra neoplasia come prima diagnosi di tumore.

Il test non ha evidenziato significatività statistica ($p = 0,282$).

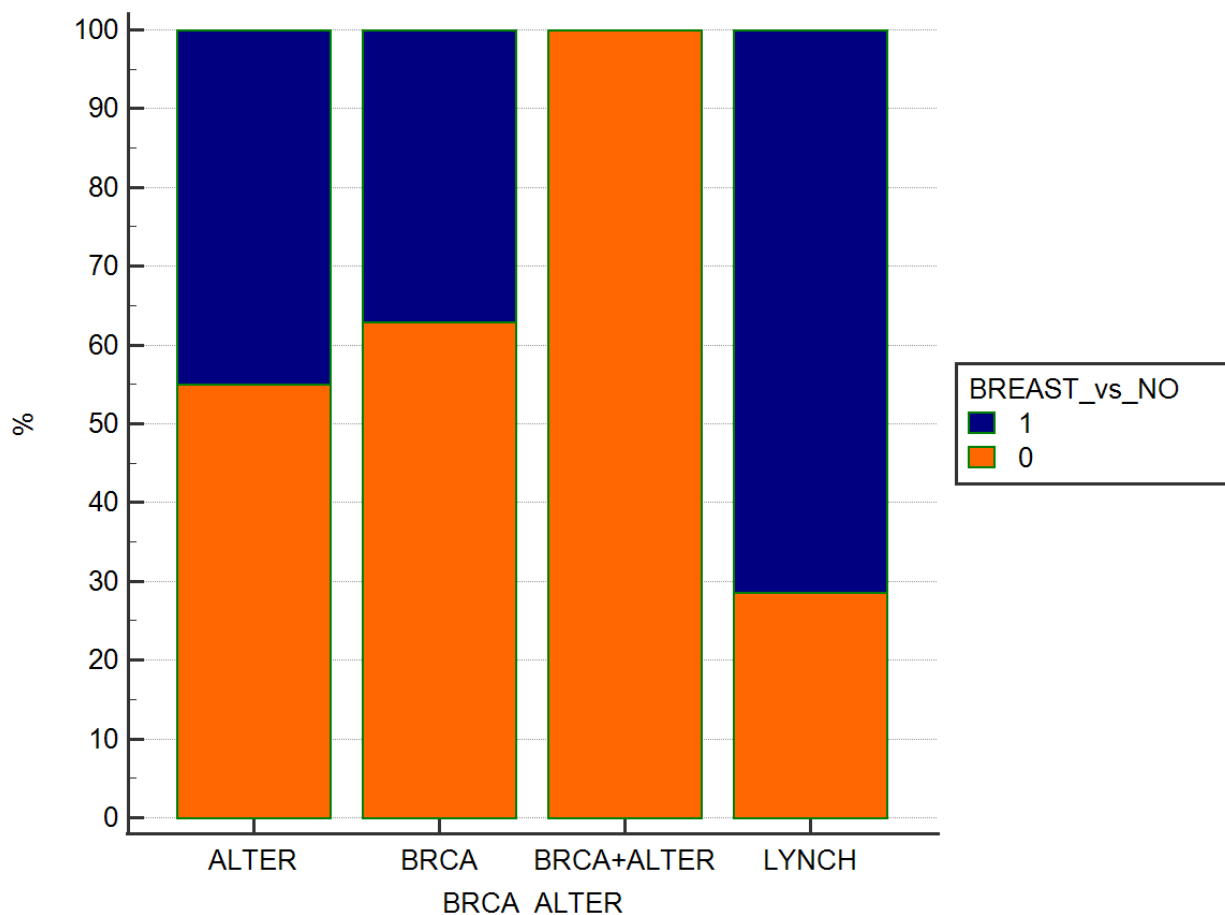


Grafico 4. Diagramma a barre che metta in relazione la presenza di mutazioni germinali con la prevalenza di carcinoma della mammella come primo tumore.

6. DISCUSSIONE:

Relativamente alla valutazione della distribuzione dell'età dei pazienti al momento dell'esecuzione del test genetico e ne abbiamo valutato la distribuzione, la mediana dell'età dei 538 pazienti inclusi nel nostro studio, al momento del test genetico è pari a 60 anni (range 18 – 92 anni), mentre la mediana dell'età della prima diagnosi di tumore dei pazienti sottoposti a test genetico (con diagnosi di tumore, cioè 475 pazienti), che è risultata essere 54 anni (range 27 – 88 anni). Mentre l'età di esecuzione del test segue una distribuzione normale, l'età della diagnosi del primo tumore non presenta una distribuzione normale, essendo asimmetrica a destra. Questo suggerisce una precocità della diagnosi di tumore nei pazienti sottoposti a test rispetto all'atteso.

Questo risultato è coerente con quanto precedentemente descritto in merito all'anticipazione e alla precocità della diagnosi di neoplasia nei pazienti con possibile predisposizione ereditaria ai tumori [39][90][91][46][88]. Il dato potrebbe tuttavia essere influenzato anche da fattori ambientali, ormonali e occupazionali, da abitudini di vita scorrette e dalla familiarità, considerata la correlazione

esistente tra tali elementi e l'insorgenza di neoplasie maligne multiple [88][89]. Uno dei limiti della nostra analisi è rappresentato dalla mancata raccolta di queste informazioni; pertanto, non è possibile discriminare il peso relativo di tali fattori rispetto alla possibile presenza di una mutazione patogenica. Successivamente, è stata valutata l'eventuale associazione tra le diverse tipologie di mutazioni indagate e l'età mediana alla prima diagnosi oncologica. Non sono emerse differenze significative tra i gruppi considerati: nei pazienti con mutazioni di BRCA, la mediana dell'età alla prima diagnosi di tumore è risultata pari a 52 anni; nei pazienti con sindrome di Lynch, pari a 52 anni; nei pazienti con mutazioni diverse da quelle associate alla sindrome di Lynch e da BRCA1-BRCA2, pari a 54 anni. Questo dato necessita di ulteriori conferme, poiché appare in controtendenza rispetto a quanto teoricamente atteso sulla base della diversa penetranza delle mutazioni esaminate. Nei pazienti portatori di mutazioni di BRCA1/2 o dei geni associati alla sindrome di Lynch, entrambe caratterizzate da elevata penetranza, ci si attenderebbe, secondo la teoria del "doppio colpo", non solo un rischio più elevato di sviluppare neoplasie, ma anche una maggiore precocità e anticipazione della diagnosi rispetto ai soggetti con mutazioni patogeniche a carico di geni a bassa penetranza, quali CHEK2, ATM e altri. I dati disponibili in letteratura indicano infatti che le mutazioni germinali dei geni BRCA1 e BRCA2 sono associate all'insorgenza di carcinoma mammario in età pari o inferiore a 50 anni, mentre mutazioni in geni a bassa penetranza, come CHEK2 e ATM, non risultano fortemente associate a una diagnosi oncologica precoce. Analogamente, il rischio assoluto di sviluppare neoplasia in giovane età è nettamente inferiore nei soggetti con mutazioni di geni a bassa penetranza rispetto ai portatori di mutazioni BRCA1/2 [92][67][51]. Allo stesso modo, le mutazioni dei geni associati alla sindrome di Lynch sono correlate a un'età più precoce di insorgenza tumorale [43][93][95].

L'analisi successiva si è focalizzata sul carcinoma mammario e sulla possibile presenza di mutazioni dello spettro Lynch o BRCA. Il carcinoma della mammella rappresenta la neoplasia più frequente nel sesso femminile e, in Italia, si stima che circa una donna su otto sviluppi questa neoplasia nel corso della vita. È noto che le mutazioni di BRCA, così come quelle di altri geni coinvolti nella ricombinazione omologa, determinano un incremento significativo del rischio lifetime di sviluppare carcinoma mammario, fino al 70-80% per BRCA1 [39][52]. Il ruolo delle mutazioni tipiche della sindrome di Lynch nell'aumentare il rischio di carcinoma mammario rimane invece meno definito. Nella nostra analisi non sono emerse differenze significative confrontando singolarmente i diversi assetti mutazionali, ossia Lynch, BRCA, HRD non-BRCA e co-mutazione BRCA più HRD non-BRCA. Tuttavia, dal confronto diretto tra i pazienti con mutazioni tipiche della sindrome di Lynch e quelli con le altre mutazioni esaminate, è emersa una differenza statisticamente significativa ($p=0,0037$). Tale risultato è in linea con quanto già riportato in letteratura e suggerisce che il

contributo delle mutazioni associate alla sindrome di Lynch al rischio di sviluppare carcinoma mammario sia meno definito rispetto a quello delle mutazioni BRCA [94][96].

Considerando che le attuali indicazioni all'esecuzione del test genetico si basano principalmente, oltre che sulla precocità della diagnosi oncologica, anche sulla familiarità e sulla presenza di neoplasie multiple nello stesso soggetto, la nostra analisi si è successivamente concentrata su questi due aspetti. Per quanto riguarda la familiarità, il nostro studio ha confermato che la presenza di un familiare di primo grado affetto da un tumore dello spettro BRCA aumenta significativamente la probabilità di identificare una mutazione patogenica. Un risultato analogo è stato osservato per la familiarità relativa ai tumori dello spettro Lynch, con un incremento della probabilità di riscontrare mutazioni patogene dello stesso spettro nel probando. Al contrario, una familiarità meno prossima, ad esempio per tumori dello spettro Lynch o BRCA in parenti di terzo grado o superiore, non è risultata associata a un aumento significativo del rischio di identificare una mutazione patogenica. Questo dato conferma quanto già noto in letteratura e rafforza l'importanza di un adeguato counseling pre-test, comprensivo della ricostruzione dell'albero genealogico, al fine di stimare correttamente il rischio pre-test di riscontrare una mutazione [39][97][43][67].

Infine, per quanto riguarda la molteplicità delle diagnosi, intesa come riscontro di più di una neoplasia nello stesso paziente, è stata confermata una differenza nell'età alla diagnosi del primo tumore tra i pazienti con neoplasie multiple e quelli sottoposti a test genetico per una singola neoplasia, in accordo con quanto riportato in letteratura [88][89]. Tuttavia, il nostro studio non ha evidenziato una diversa probabilità di presentare diagnosi multiple rispetto a una diagnosi singola in relazione al tipo di mutazione patogenica riscontrata.

7. CONCLUSIONI:

Il presente studio, condotto su una coorte di 538 pazienti selezionati secondo i criteri definiti dalle linee guida AIOM per la sindrome HBOC e la sindrome di Lynch, ha consentito di valutare il ruolo del test genetico nell'identificazione di mutazioni germinali associate a tali sindromi ereditarie.

I pazienti inclusi nella coorte presentavano raramente un'età avanzata al momento della diagnosi, dato coerente con la possibile anticipazione diagnostica tipica delle neoplasie eredo-familiari. È stata inoltre confermata la possibile diversa associazione tra le mutazioni di BRCA, degli altri geni correlati al deficit della ricombinazione omologa e dei geni della sindrome di Lynch, da un lato, e il rischio di sviluppare carcinoma mammario, dall'altro.

Tra gli aspetti che meritano ulteriori approfondimenti in studi futuri vi sono l'assenza di una correlazione tra molteplicità delle diagnosi tumorali e specifiche tipologie di mutazione, nonché la mancata associazione tra i diversi assetti mutazionali e l'età di insorgenza della neoplasia.

8. BIBLIOGRAFIA:

1. Siegel RL, Kratzer TB, Wagle NS, Sung H, Jemal A. **Cancer statistics, 2026. CA A Cancer J Clinicians. gennaio 2026**;76(1):e70043. doi:[10.3322/caac.70043](https://doi.org/10.3322/caac.70043)
2. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>, accessed [DD Month YYYY].
3. Fabiano S, Perotti V, Contiero P, Tittarelli A, Pesce MT, Guzzinati S, et al. Estimates of cancer incidence to 2025 in Italy: Numbers and rates. **Cancer Epidemiology. aprile 2026**;101:102990. doi:[10.1016/j.canep.2026.102990](https://doi.org/10.1016/j.canep.2026.102990)
4. **ECIS - European Cancer Information System**, <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/data-explorer#/>, 2025 (accessed 09 January 2026).
5. Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. **Cancers. 25 agosto 2021**;13(17):4287. doi:[10.3390/cancers13174287](https://doi.org/10.3390/cancers13174287)
6. **AIOM**, linee guida carcinoma della mammella in stadio precoce, 2023, https://www.iss.it/documents/20126/8403839/LG_C0013_AIOM_Ca-mammario-precoce.pdf/fb5df1bd-2712-9166-68e7-6e296912776e?t=1704702928747
7. **ACS . American Cancer Society (2016)** Breast Cancer Facts & Figures, 2015–2016. American Cancer Society; Atlanta, GA, USA: 2016. <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2015->

[2016.pdf&ved=2ahUKEWjKmPKBhq6TAxUFnf0HHeUHGP0QFnoECBcQAQ&usg=AOvVaw19Oekj8Pb37yihNpQO_FSG](#)

8. Shiovitz S, Korde LA. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. **Annals of Oncology**. **luglio 2015**;26(7):1291–9. doi:[10.1093/annonc/mdv022](#)
9. Russo J, Moral R, Balogh GA, Mailo D, Russo IH. The protective role of pregnancy in breast cancer. **Breast Cancer Res**. **giugno 2005**;7(3):131. doi:[10.1186/bcr1029](#)
10. Mørch LS, Skovlund CW, Hannaford PC, Iversen L, Fielding S, Lidegaard Ø. Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. **N Engl J Med**. **7 dicembre 2017**;377(23):2228–39. doi:[10.1056/NEJMoa1700732](#)
11. Siitonen H, Joensuu J, Savolainen-Peltonen H, Gissler M, Ylikorkala O, Mikkola TS. Update of the impact of menopausal hormone therapy on breast cancer risk. **European Journal of Cancer**. **maggio 2025**;220:115340. doi:[10.1016/j.ejca.2025.115340](#)
12. Chen CL, Weiss NS, Newcomb P, Barlow W, White E. Hormone replacement therapy in relation to breast cancer. **JAMA**. **2002 Feb 13**;287(6):734-41. doi: 10.1001/jama.287.6.734. PMID: 11851540.
13. Fiolet T, Srour B, Sellem L, Kesse-Guyot E, Allès B, Méjean C, et al. Consumption of ultra-processed foods and cancer risk: results from NutriNet-Santé prospective cohort. **BMJ**. **14 febbraio 2018**;k322. doi:[10.1136/bmj.k322](#)
14. Guo W, Fensom GK, Reeves GK, Key TJ. Physical activity and breast cancer risk: results from the UK Biobank prospective cohort. **Br J Cancer**. **3 marzo 2020**;122(5):726–32. doi:[10.1038/s41416-019-0700-6](#)
15. Labianca R, Cascinu. S La **Medicina Oncologica, Diagnosi, terapia e gestione clinica**.I Edizione, Milano: Edra, 2013.

16. Probert J, Broggio J, Darby SC, Dodwell D, McGale P, Taylor C, et al. Histological types of invasive breast cancer in 830,000 women diagnosed in England during 1988–2016. **The Journal of Pathology CR.** settembre 2025;11(5):e70043. doi:[10.1002/2056-4538.70043](https://doi.org/10.1002/2056-4538.70043)

17. [Felipe Ades et al.](#) Luminal B Breast Cancer: Molecular Characterization, Clinical Management, and Future Perspectives. **J Clin Oncol** 32, 2794-2803(2014). DOI:[10.1200/JCO.2013.54.1870](https://doi.org/10.1200/JCO.2013.54.1870)

18. Lammers SWM, Geurts SME, Hermans KEPE, Kooreman LFS, Swinkels ACP, Smorenburg CH, et al. The prognostic and predictive value of the luminal-like subtype in hormone receptor-positive breast cancer: an analysis of the DATA trial. **ESMO Open.** febbraio 2025;10(2):104154. doi:[10.1016/j.esmoop.2025.104154](https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2025.104154)

19. Yu NY, Iftimi A, Yau C, et al. Assessment of Long-term Distant Recurrence-Free Survival Associated With Tamoxifen Therapy in Postmenopausal Patients With Luminal A or Luminal B Breast Cancer. **JAMA Oncol.**2019;5(9):1304–1309. doi:[10.1001/jamaoncol.2019.1856](https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.1856)

20. Andre F, Ismaila N, Allison KH, Barlow WE, Collyar DE, Damodaran S, et al. Biomarkers for Adjuvant Endocrine and Chemotherapy in Early-Stage Breast Cancer: **ASCO Guideline Update.** **JCO.** 1 giugno 2022;40(16):1816–37. doi:[10.1200/JCO.22.00069](https://doi.org/10.1200/JCO.22.00069)

21. Syed YY. Oncotype DX Breast Recurrence Score®: A Review of its Use in Early-Stage Breast Cancer. **Mol Diagn Ther.** ottobre 2020;24(5):621–32. doi:[10.1007/s40291-020-00482-7](https://doi.org/10.1007/s40291-020-00482-7)

22. <https://www.oncotypedxtest.com/healthcare-professionals/what-is-the-oncotype-dx-test>

23. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Adjuvant Chemotherapy Guided by a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. **N Engl J Med.** 12 luglio 2018;379(2):111–21. doi:[10.1056/NEJMoa1804710](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1804710)

24. Kalinsky K, Barlow WE, Gralow JR, Meric-Bernstam F, Albain KS, Hayes DF, et al. 21-Gene Assay to Inform Chemotherapy Benefit in Node-Positive Breast Cancer. **N Engl J Med.** 16 dicembre 2021;385(25):2336–47. doi:[10.1056/NEJMoa2108873](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2108873)

25. Bernardi D, Macaskill P, Pellegrini M, Valentini M, Fantò C, Ostilio L, et al. Breast cancer screening with tomosynthesis (3D mammography) with acquired or synthetic 2D mammography compared with 2D mammography alone (STORM-2): a population-based prospective study. **The Lancet Oncology**. agosto 2016;17(8):1105–13. doi:[10.1016/S1470-2045\(16\)30101-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30101-2)

26. NIH, National Cancer Institute, Stages of Breast Cancer, <https://www.cancer.gov/types/breast/stages-how-breast-cancer-stage-is-determined>

27. Loibl S, André F, Bachelot T, Barrios CH, Bergh J, Burstein HJ, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**. febbraio 2024;35(2):159–82. doi:[10.1016/j.annonc.2023.11.016](https://doi.org/10.1016/j.annonc.2023.11.016)

28. Moran MS, Zhao Y, Ma S, et al. Association of Radiotherapy Boost for Ductal Carcinoma In Situ With Local Control After Whole-Breast Radiotherapy. **JAMA Oncol**. 2017;3(8):1060–1068. doi:[10.1001/jamaoncol.2016.6948](https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.6948)

29. Chua BH, Link EK, Kunkler IH, Whelan TJ, Westenberg AH, Gruber G, et al. Radiation doses and fractionation schedules in non-low-risk ductal carcinoma in situ in the breast (BIG 3–07/TROG 07.01): a randomised, factorial, multicentre, open-label, phase 3 study. **The Lancet**. agosto 2022;400(10350):431–40. doi:[10.1016/S0140-6736\(22\)01246-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01246-6)

30. DeCensi A, Puntoni M, Guerrieri-Gonzaga A, Caviglia S, Avino F, Cortesi L, et al. Randomized Placebo Controlled Trial of Low-Dose Tamoxifen to Prevent Local and Contralateral Recurrence in Breast Intraepithelial Neoplasia. **JCO**. 1 luglio 2019;37(19):1629–37. doi:[10.1200/JCO.18.01779](https://doi.org/10.1200/JCO.18.01779)

31. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. **The Lancet**. novembre 2011;378(9804):1707–16. doi:[10.1016/S0140-6736\(11\)61629-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61629-2)

32. Bartelink H, Maingon P, Poortmans P, Weltens C, Fourquet A, Jager J, et al. Whole-breast irradiation with or without a boost for patients treated with breast-conserving surgery for early breast cancer: 20-year follow-up of a randomised phase 3 trial. **The Lancet Oncology**. gennaio 2015;16(1):47–56. doi:[10.1016/S1470-2045\(14\)71156-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71156-8)

33. **AIOM**, Linee guida carcinoma della mammella avanzato, **2023**,
https://www.iss.it/documents/20126/8403839/LG_C008_AIOM_Ca-mammario-avanzato-TTT2.pdf
34. **AIOM**, Linee guida carcinoma dell'ovaio, **2021**,
https://www.iss.it/documents/20126/8403839/LG+502+AIOM_Ca+ovaio+2021.pdf/3abde408-f998-b226-8826-4b3a4ec59c51?t=1678805397799
35. Prat J, D'Angelo E, Espinosa I. Ovarian carcinomas: at least five different diseases with distinct histological features and molecular genetics. **Human Pathology**. ottobre **2018**;80:11–27. doi:[10.1016/j.humpath.2018.06.018](https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.06.018)
36. Paluch-Shimon S, Cardoso F, Sessa C, Balmana J, Cardoso MJ, Gilbert F, et al. Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention and screening. **Annals of Oncology**. settembre **2016**;27:v103–10. doi:[10.1093/annonc/mdw327](https://doi.org/10.1093/annonc/mdw327)
37. González-Martín A, Harter P, Leary A, Lorusso D, Miller RE, Pothuri B, et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**. ottobre **2023**;34(10):833–48. doi:[10.1016/j.annonc.2023.07.011](https://doi.org/10.1016/j.annonc.2023.07.011)
38. [Kathryn Alsop et al.](#) BRCA Mutation Frequency and Patterns of Treatment Response in BRCA Mutation–Positive Women With Ovarian Cancer: A Report From the Australian Ovarian Cancer Study Group. **J Clin Oncol** **30**, 2654-2663(2012). DOI:[10.1200/JCO.2011.39.8545](https://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.8545)
39. **AIOM**, Linee guida sindromi di predisposizione ereditaria ai tumori, tumori associati ai geni della ricombinazione omologa, **2025**,
https://www.iss.it/documents/20126/8403839/LG_C0044_AIOM_Tumori+eredofamiliari.pdf/001650c3-552a-0435-248a-4bfb6359e024?t=1773132541355
40. Dodge JE, Covens AL, Lacchetti C, Elit LM, Le T, Devries–Aboud M, et al. Management of a Suspicious Adnexal Mass: A Clinical Practice Guideline. **Current Oncology**. 1 agosto **2012**;19(4):244–57. doi:[10.3747/co.19.980](https://doi.org/10.3747/co.19.980)

41. Turchetti D, Tagliafico E, Maria ED. Linee di indirizzo sull'analisi dei geni BRCA1 e BRCA2 in ambito clinico: criteri di accesso al test, aggiornamento sulle piattaforme diagnostiche e interpretazione del test somatico. **SIGU, 2021.** https://sigu.net/wp-content/uploads/2021/03/Linee-di-indirizzo-sullanalisi-dei-geni-BRCA1-e-BRCA2-in-ambito-clinico-Rev1_2021.pdf
42. **AIOM**, Raccomandazioni per l'implementazione del test BRCA predittivo e preventivo nei tumori della mammella, dell'ovaio, del pancreas e della prostata, **2021**, https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2021/07/2021_Racc_testBRCA_predittivo-preventivo.pdf
43. **AIOM**, Raccomandazioni AIOM, I tumori ereditari dello stomaco e del colon-retto, **2022**, https://www.aiom.it/wpcontent/uploads/2022/01/2022.01_Racc_Tumori_ereditari_GI.pdf
44. Peltomäki P, Nyström M, Mecklin JP, Seppälä TT. Lynch Syndrome Genetics and Clinical Implications. **Gastroenterology.** aprile **2023**;164(5):783–99. doi:[10.1053/j.gastro.2022.08.058](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.08.058)
45. Valachis A, Nearchou AD, Lind P. Surgical management of breast cancer in BRCA-mutation carriers: a systematic review and meta-analysis. **Breast Cancer Res Treat.** aprile **2014**;144(3):443–55. doi:[10.1007/s10549-014-2890-1](https://doi.org/10.1007/s10549-014-2890-1)
46. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers. **JAMA.** **2017**;317(23):2402–2416. doi:[10.1001/jama.2017.7112](https://doi.org/10.1001/jama.2017.7112)
47. Buys SS, Partridge E, Black A, et al. Effect of Screening on Ovarian Cancer Mortality: The Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. **JAMA.** **2011**;305(22):2295–2303. doi:[10.1001/jama.2011.766](https://doi.org/10.1001/jama.2011.766)
48. **AIOM**, Raccomandazioni per l'implementazione del test universale su carcinomi colorettali ed endometriali per l'identificazione della Sindrome di LYNCH, **2022**, https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2022/01/2022.01_Racc_Test_Lynch.pdf
49. AIOM, Consulenza genetica e test genetici in oncologia: aspetti critici e proposte di AIOM – SIGU, 2021,

50. Tung NM, Boughey JC, Pierce LJ, Robson ME, Bedrosian I, Dietz JR, et al. Management of Hereditary Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology, American Society for Radiation Oncology, and Society of Surgical Oncology Guideline. **JCO**. **20 giugno 2020**;38(18):2080–106. doi:[10.1200/JCO.20.00299](https://doi.org/10.1200/JCO.20.00299)
51. Breast Cancer Association Consortium. Breast Cancer Risk Genes — Association Analysis in More than 113,000 Women. **N Engl J Med**. **4 febbraio 2021**;384(5):428–39. doi:[10.1056/NEJMoa1913948](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1913948)
52. 1. Sessa C, Balmaña J, Bober SL, Cardoso MJ, Colombo N, Curigliano G, et al. Risk reduction and screening of cancer in hereditary breast-ovarian cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guideline. **Annals of Oncology**. **gennaio 2023**;34(1):33–47. doi:[10.1016/j.annonc.2022.10.004](https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.10.004)
53. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995 Dec 21-28;378(6559):789-92. doi: 10.1038/378789a0.
54. Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10(8), 789–799. <https://doi.org/10.1038/nm1087>.
55. Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1997). Gatekeepers and caretakers. *Nature*, 386(6627), 761–763. <https://doi.org/10.1038/386761a0>
56. Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. **Nat Rev Mol Cell Biol**. **gennaio 2014**;15(1):7–18. doi:[10.1038/nrm3719](https://doi.org/10.1038/nrm3719)
57. Isono M, Niimi A, Oike T, Hagiwara Y, Sato H, Sekine R, et al. BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. **Cell Reports**. **gennaio 2017**;18(2):520–32. doi:[10.1016/j.celrep.2016.12.042](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.042)
58. Ahn J, Urist M, Prives C. The Chk2 protein kinase. **DNA Repair**. **agosto 2004**;3(8–9):1039–47. doi:[10.1016/j.dnarep.2004.03.033](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.033)

59. Cezary Cybulski et al. Risk of Breast Cancer in Women With a *CHEK2* Mutation With and Without a Family History of Breast Cancer. *J Clin Oncol* **29**, 3747-3752(2011). DOI:[10.1200/JCO.2010.34.0778](https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.0778)
60. Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C, Tybjærg-Hansen A, Nordestgaard BG. *CHEK2* *1100delC Genotyping for Clinical Assessment of Breast Cancer Risk: Meta-Analyses of 26,000 Patient Cases and 27,000 Controls. *JCO*. **1 febbraio 2008**;26(4):542–8. doi:[10.1200/JCO.2007.12.5922](https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.5922)
61. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. **2013** Mar 29;339(6127):1546-58. doi: 10.1126/science.1235122. PMID: 23539594; PMCID: PMC3749880.
62. Hu C, Hart SN, Gnanaolivu R, Huang H, Lee KY, Na J, Gao C, Lilyquist J, Yadav S, Boddicker NJ, Samara R, Klebba J, Ambrosone CB, Anton-Culver H, Auer P, Bandera EV, Bernstein L, Bertrand KA, Burnside ES, Carter BD, Eliassen H, Gapstur SM, Gaudet M, Haiman C, Hodge JM, Hunter DJ, Jacobs EJ, John EM, Kooperberg C, Kurian AW, Le Marchand L, Lindstroem S, Lindstrom T, Ma H, Neuhausen S, Newcomb PA, O'Brien KM, Olson JE, Ong IM, Pal T, Palmer JR, Patel AV, Reid S, Rosenberg L, Sandler DP, Scott C, Tamimi R, Taylor JA, Trentham-Dietz A, Vachon CM, Weinberg C, Yao S, Ziogas A, Weitzel JN, Goldgar DE, Domchek SM, Nathanson KL, Kraft P, Polley EC, Couch FJ. A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. *N Engl J Med*. **2021** Feb 4;384(5):440-451. doi: 10.1056/NEJMoa2005936. Epub 2021 Jan 20. PMID: 33471974; PMCID: PMC8127622.
63. Clark SL, Rodriguez AM, Snyder RR, Hankins GD, Boehning D. Structure-Function Of The Tumor Suppressor BRCA1. *Comput Struct Biotechnol J*. **2012** Apr 1;1(1):e201204005. doi: 10.5936/csbj.201204005. PMID: 22737296; PMCID: PMC3380633.
64. Flynn RL, Zou L. Oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold proteins: a growing family of genome guardians. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. **2010** Aug;45(4):266-75. doi: 10.3109/10409238.2010.488216. PMID: 20515430; PMCID: PMC2906097.
65. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer*. **2011 Dec 23**;12(1):68-78. doi: 10.1038/nrc3181. PMID: 22193408; PMCID: PMC4972490.

66. Khalizieva A, Moser SC, Bouwman P, Jonkers J. BRCA1 and BRCA2: from cancer susceptibility to synthetic lethality. **Genes Dev.** **2025 Jan 7**;39(1-2):86-108. doi: 10.1101/gad.352083.124. PMID: 39510841; PMCID: PMC11789497.
67. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. 1998 Sep 4 [Updated 2025 Mar 20]. In: Adam MP, Bick S, Mirzaa GM, et al., editors. **GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2026.** Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/>.
68. Nielsen, F., van Overeem Hansen, T. & Sørensen, C. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. *Nat Rev Cancer* **16**, 599–612 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.72>.
69. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, Barrowdale D, Pylkäs K, Roberts J, Lee A, Subramanian D, De Leeneer K, Fostira F, Tomiak E, Neuhausen SL, Teo ZL, Khan S, Aittomäki K, Moilanen JS, Turnbull C, Seal S, Mannermaa A, Kallioniemi A, Lindeman GJ, Buys SS, Andrulis IL, Radice P, Tondini C, Manoukian S, Toland AE, Miron P, Weitzel JN, Domchek SM, Poppe B, Claes KB, Yannoukakos D, Concannon P, Bernstein JL, James PA, Easton DF, Goldgar DE, Hopper JL, Rahman N, Peterlongo P, Nevanlinna H, King MC, Couch FJ, Southey MC, Winqvist R, Foulkes WD, Tischkowitz M. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. **N Engl J Med.** **2014 Aug 7**;371(6):497-506. doi: 10.1056/NEJMoa1400382. PMID: 25099575; PMCID: PMC4157599.
70. Michael Choi, Thomas Kipps, Razelle Kurzrock; ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther* **1 August 2016**; 15 (8): 1781–1791. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0945>.
71. Silwal-Pandit L, Langerød A, Børresen-Dale AL. TP53 Mutations in Breast and Ovarian Cancer. **Cold Spring Harb Perspect Med.** **2017 Jan 3**;7(1):a026252. doi: 10.1101/cshperspect.a026252. PMID: 27815305; PMCID: PMC5204332.
72. Wang H, Guo M, Wei H, Chen Y. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. **Signal Transduct Target Ther.** **2023 Mar 1**;8(1):92. doi: 10.1038/s41392-023-01347-1. PMID: 36859359; PMCID: PMC9977964.
73. Kruse, J.-P. & Gu, W. Modes of p53 Regulation. *Cell* **137**, 609–622 (2009).

74. Stolz A, Ertych N, Bastians H. Tumor suppressor CHK2: regulator of DNA damage response and mediator of chromosomal stability. **Clin Cancer Res.** **2011** Feb 1;17(3):401-5. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1215. Epub 2010 Nov 18. PMID: 21088254.
75. Southey MC, Goldgar DE, Winqvist R, et al PALB2, CHEK2 and ATM rare variants and cancer risk: data from COGS **Journal of Medical Genetics** **2016**;53:800-811.
76. Zhang F, Fan Q, Ren K, Andreassen PR. PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. **Mol Cancer Res.** **2009** Jul;7(7):1110-8. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0123. Epub 2009 Jul 7. PMID: 19584259; PMCID: PMC4928587.
77. Kaniecki, K., De Tullio, L. & Greene, E. A change of view: homologous recombination at single-molecule resolution. *Nat Rev Genet* 19, 191–207 (2018). <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.92>.
78. Renkawitz J, Lademann CA, Jentsch S. Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Jun;15(6):369-83. doi: 10.1038/nrm3805. Epub 2014 May 14. PMID: 24824069.
79. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2012;2012:1–11. doi:[10.1155/2012/251364](https://doi.org/10.1155/2012/251364)
80. <https://www.thermofisher.com/it/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-workflow.html>
81. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. **Human Immunology.** **novembre 2021**;82(11):801–11. doi:[10.1016/j.humimm.2021.02.012](https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012)
82. Tucker T, Marra M, Friedman JM. Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine. **The American Journal of Human Genetics.** **agosto 2009**;85(2):142–54. doi:[10.1016/j.ajhg.2009.06.022](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.06.022)
83. Lorenz TC. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **JoVE.** **22 maggio 2012**;(63):3998. doi:[10.3791/3998](https://doi.org/10.3791/3998)
84. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. **(1986)** Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Symposia on

Quantitative Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 263-273. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>

85. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**. dicembre 1977;74(12):5463–7. doi:[10.1073/pnas.74.12.5463](https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463)

86. AIOM, Seno e ovaio. Il 10% dei tumori sono ereditari, 2018, <https://www.aiom.it/seno-e-ovaio-il-10-dei-tumori-sono-ereditari/>

87. Torres-Esquius S, Llop-Guevara A, Gutiérrez-Enríquez S, Romey M, Teulé À, Llort G, et al. Prevalence of Homologous Recombination Deficiency Among Patients With Germline *RAD51C/D* Breast or Ovarian Cancer. *JAMA Netw Open*. 22 aprile 2024;7(4):e247811. doi:[10.1001/jamanetworkopen.2024.7811](https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2024.7811)

88. Vogt A, Schmid S, Heinimann K, Frick H, Herrmann C, Cerny T, et al. Multiple primary tumours: challenges and approaches, a review. *ESMO Open*. 2017;2(2):e000172. doi:[10.1136/esmoopen-2017-000172](https://doi.org/10.1136/esmoopen-2017-000172)

89. Okeke F, Nriagu VC, Nwaneki CM, Magacha HM, Omenuko NJ, Anazor S. Factors That Determine Multiple Primary Cancers in the Adult Population in the United States. *Cureus*. 10 settembre 2023. doi:[10.7759/cureus.44993](https://doi.org/10.7759/cureus.44993)

90. Okano M, Nomizu T, Tachibana K, Nagatsuka M, Matsuzaki M, Katagata N, et al. The relationship between BRCA-associated breast cancer and age factors: an analysis of the Japanese HBOC consortium database. *J Hum Genet*. marzo 2021;66(3):307–14. doi:[10.1038/s10038-020-00849-y](https://doi.org/10.1038/s10038-020-00849-y)

91. Mork ME, You YN, Ying J, Bannon SA, Lynch PM, Rodriguez-Bigas MA, et al. High Prevalence of Hereditary Cancer Syndromes in Adolescents and Young Adults With Colorectal Cancer. *JCO*. 1 novembre 2015;33(31):3544–9. doi:[10.1200/JCO.2015.61.4503](https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.4503)

92. Daly MB, Rosenthal E, Cummings S, Bernhisel R, Kidd J, Hughes E, et al. The association between age at breast cancer diagnosis and prevalence of pathogenic variants. *Breast Cancer Res Treat*. giugno 2023;199(3):617–26. doi:[10.1007/s10549-023-06946-8](https://doi.org/10.1007/s10549-023-06946-8)

93. Pearlman R, Frankel WL, Swanson B, Zhao W, Yilmaz A, Miller K, et al. Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* 1 aprile 2017;3(4):464. doi:[10.1001/jamaoncol.2016.5194](https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5194)
94. Incorvaia L, Bazan Russo TD, Gristina V, Perez A, Brando C, Mujacic C, et al. The intersection of homologous recombination (HR) and mismatch repair (MMR) pathways in DNA repair-defective tumors. *npj Precis Onc.* 5 settembre 2024;8(1):190. doi:[10.1038/s41698-024-00672-0](https://doi.org/10.1038/s41698-024-00672-0)
95. Talbot A, O'Donovan E, Berkley E, Nolan C, Clarke R, Gallagher D. The contribution of Lynch syndrome to early onset malignancy in Ireland. *BMC Cancer.* dicembre 2021;21(1):617. doi:[10.1186/s12885-021-08263-z](https://doi.org/10.1186/s12885-021-08263-z)
96. Stoll J, Rosenthal E, Cummings S, Willmott J, Bernhisel R, Kupfer SS. No Evidence of Increased Risk of Breast Cancer in Women With Lynch Syndrome Identified by Multigene Panel Testing. *JCO Precision Oncology.* novembre 2020;(4):51–60. doi:[10.1200/PO.19.00271](https://doi.org/10.1200/PO.19.00271)
97. Ren M, Orozco A, Shao K, Albanez A, Ortiz J, Cao B, et al. Germline variants in hereditary breast cancer genes are associated with early age at diagnosis and family history in Guatemalan breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* settembre 2021;189(2):533–9. doi:[10.1007/s10549-021-06305-5](https://doi.org/10.1007/s10549-021-06305-5)
98. Idos G, Valle L. Lynch Syndrome. 2004 Feb 5 [Updated 2021 Feb 4]. In: Adam MP, Bick S, Mirzaa GM, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2026. Bookshelf URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
99. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Genetic/Familial High – Risk Assessment: Colorectal, Endometrial, and Gastric, Version 1.2025 – June 13, 2025.