

OncoNext™ RISK – Gastric

Cos'è il tumore?

Il **tumore**, oggi, può essere considerato una patologia a componente genetica caratterizzata da una crescita cellulare incontrollata. Le cellule del nostro corpo ricevono dei segnali che indicano loro quando crescere e moltiplicarsi e quando tale crescita deve arrestarsi. Nel tumore tali cellule, a causa di alterazioni del proprio patrimonio genetico, non rispondono ai segnali di controllo e crescono e si moltiplicano irregolarmente diffondendosi in diverse parti del corpo.

L'evento che determina l'alterazione della funzione dei geni viene definito "**mutazione**". Quando un gene subisce una mutazione per varie cause (biologiche, chimiche, fisiche), le informazioni che arriveranno alla cellula saranno improprie per le funzioni a cui è deputata.

I tumori sono ereditari?

Le neoplasie sono per lo più patologie multifattoriali alla cui insorgenza partecipano fattori di rischio di tipo costituzionale e ambientale. La maggior parte dei tumori sono cosiddetti "**sporadici**", cioè si manifestano nella popolazione generale senza che ci siano elementi che facciano sospettare la presenza di un chiaro fattore predisponente su base genetica. In questo genere di tumori, le **alterazioni del DNA (mutazioni)** si sviluppano casualmente a livello delle cellule somatiche, cioè quelle cellule che costituiscono ogni organo ed apparato del nostro organismo. Queste mutazioni si originano nel DNA di un ristretto gruppo di cellule e determineranno l'errore genetico che si perpetuerà nelle discendenti di quelle cellule, le quali accumulandosi in un determinato organo si sostituiranno inizialmente al tessuto sano per poi diffondersi in altri organi vicini o a distanza (metastasi).

Esistono però delle forme di tumore che possono essere definite "**familiari**", in quanto le persone affette della famiglia presentano fra di loro uno stretto legame di parentela. La familiarità costituisce, senz'altro, un importante fattore di rischio, per lo più dovuto alla condivisione di fattori di rischio ambientali comuni (abitudini di vita, dieta, inquinanti, etc.), senza che vi sia una specifica alterazione genetica predisponente alla malattia.

Solo una piccola, anche se significativa, percentuale dei tumori sono cosiddetti "**ereditari**". Oggi si stima che circa il **10 % dei tumori colon-rettali** abbiano una componente **ereditaria**. In questi tumori le mutazioni del DNA insorgono a livello delle cellule germinali o riproduttive e quindi potranno essere trasmesse alla progenie. L'individuo avrà alla nascita quel difetto genetico su uno o più geni in tutte le cellule dell'organismo, e sarà quindi predisposto a sviluppare una neoplasia quando, nel corso della vita, altre mutazioni si sommeranno a quella predisponente.

Ogni persona all'atto del suo concepimento, acquisisce due copie di ciascun gene, una copia viene trasmessa dal padre ed una dalla madre: eventuali alterazioni geniche presenti nel patrimonio genetico dei genitori verranno pertanto trasmesse ai figli. Se uno dei genitori presenta una mutazione a livello di uno dei geni coinvolti nell'insorgenza di un determinato tumore (ereditario), **i figli possiedono il 50% di probabilità di ereditare quella mutazione**. Le persone che ereditano una mutazione germinale in questi geni nascono con una copia del gene mutata. Queste persone **non ereditano il tumore, ma solamente la predisposizione a sviluppare più facilmente quel tumore** rispetto alla popolazione generale.

Il test OncoNext™ Risk Gastric

OncoNext™ Risk Gastric è un test diagnostico, sviluppato da GENOMA Group, che permette di eseguire un'analisi genetica multipla **per valutare la predisposizione allo sviluppo del tumore Gastrico**. Il test, quindi, permette di identificare i pazienti a rischio di insorgenza della suddetta neoplasia attraverso l'analisi del loro DNA.

Per chi è indicato il test OncoNext™ Risk Gastric?

Il test di predisposizione genetica è indirizzato a quelle persone che ad una approfondita anamnesi familiare risultano con elevata e specifica incidenza di malattie neoplastiche nelle generazioni precedenti, e pertanto ad elevato rischio di essere portatori di mutazione germinale.

Si può sospettare una forma ereditaria di neoplasia quando in una famiglia vi sono:

- diversi soggetti affetti dallo stesso tipo di tumore o tumori correlati,
- soggetti affetti da tumori multipli,
- tumori insorti in età giovanile.

Lo specialista, con il consenso informato della persona, deciderà se è indicato procedere con il test diagnostico di mutazione del DNA.

Quali sono i benefici del test OncoNext™ Risk Gastric?

La possibilità di individuare i soggetti a rischio di sviluppare una neoplasia rappresenta oggi il miglior metodo per giungere ad una diagnosi precoce del tumore e quindi per ridurre la mortalità in tale patologia.

I membri di famiglie ad alto rischio ereditario, ed in particolare chi è stato interessato direttamente da una neoplasia, può richiedere una consulenza genetica e discutere con il genetista circa la propria situazione clinico-genetica. Tale valutazione potrà promuovere il test genetico per accertare se il paziente è portatore di una mutazione che predispone allo sviluppo di un tumore specifico.

In caso di positività del test l'accertamento potrà essere esteso ai familiari del paziente, al fine di individuare i soggetti a rischio.

L'informazione ottenuta dal test genetico può apportare notevoli **benefici**, quali:

- L'identificazione dei membri di una famiglia che sono ad **alto rischio di sviluppare il tumore**;
- L'organizzazione di un adeguato **programma di controllo medico** riservato ai soggetti ad alto rischio, in maniera tale da facilitare la diagnosi precoce all'insorgenza del tumore;
- La conoscenza della possibilità di **trasmissione delle mutazioni geniche** alla progenie e l'individuazione dei soggetti figli, con mutazioni geniche germinali, ad alto rischio;
- La valutazione di eventuali indicazioni a terapie di **profilassi preventiva**.

Come viene effettuato il test OncoNext™ Risk Gastric?

Il test viene eseguito mediante il prelievo di un campione ematico. Tramite un'analisi complessa di laboratorio, il DNA viene isolato dalle cellule nucleate ed **amplificato mediante tecnica PCR**. Successivamente, attraverso un processo tecnologico avanzato di **sequenziamento massivo parallelo (MPS)**, che impiega tecniche di **Next Generation Sequencing (NGS)** utilizzando sequenziatori **ILLUMINA**, si sequenziano completamente, ad elevata profondità di lettura, **11 geni** (esoni e regioni introniche adiacenti, ± 5 nucleotidi) (Tabella 1) coinvolti nella maggior parte dei casi di predisposizione ereditaria allo sviluppo del tumore Gastrico:

APC, BMPR1A, CDH1, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, STK11, SMAD4, TP53.

Le sequenze geniche ottenute vengono analizzate attraverso un'**avanzata analisi bioinformatica**, per determinare la presenza di eventuali mutazioni nei geni in esame.

Risultati ottenibili con il test OncoNext™ Risk Gastric

“POSITIVO” – Presenza di una o più mutazioni: indica che il test ha rilevato una o più mutazioni a livello di uno (o più) geni responsabile della predisposizione ereditaria allo sviluppo del del tumore al Colon-retto o della Poliposi Adenomatosa Familiare, cioè presentano una copia del gene mutata. Il nostro genetista, in sede di consulenza genetica, spiegherà in maniera dettagliata il significato del risultato del test, fornendo una stima in termini probabilistici riguardo il rischio di sviluppare il tumore specifico, associato a quel tipo di mutazione riscontrata in un particolare gene.

Un risultato positivo non significa che il paziente ai cui è stata riscontrata una mutazione svilupperanno necessariamente il tumore, ma solamente che quel paziente ha una **predisposizione a sviluppare il tumore**, cioè possiede un **rischio maggiore** rispetto ad una persona che non presenta la specifica mutazione. Infatti, non tutte le persone che sono portatrici di mutazione sviluppano la patologia neoplastica; sebbene queste mutazioni aumentano notevolmente il

rischio di insorgenza del tumore, questo non si sviluppa finché la copia normale del gene corrispondente non viene soggetta a mutazione nel corso della vita.

Poiché ciascuna persona eredita due copie dello stesso gene, deve incorrere un evento mutazionale in ciascuna copia per sopprimere la funzione di quel gene; l'acquisizione di una nuova mutazione può quindi provocare direttamente l'insorgenza del tumore. L'identificazione di una mutazione predisponente permette di stabilire un protocollo di controlli clinici ravvicinati e di valutare l'opportunità di interventi preventivi. Permette inoltre di estendere l'esame ad altri familiari a rischio che desiderino eseguirlo. In questi ultimi l'analisi ha valore di test predittivo, perché consente di distinguere, all'interno di queste famiglie, i soggetti portatori della mutazione dai non portatori, identificando con precisione gli individui che presentano un elevato rischio di tumore e coloro il cui rischio è paragonabile a quello della popolazione generale. In questo modo, i primi potranno essere avviati in maniera mirata a specifici programmi di sorveglianza, al fine di una diagnosi precoce, o di profilassi, mentre i secondi potranno essere indirizzati ai controlli previsti per la popolazione generale.

Le mutazioni riscontrabili tramite il test **OncoNext™ Risk Gastric** possono rientrare nelle seguenti categorie prognostiche:

- **con significato patologico noto;**
- **con significato benigno** in quanto sono riscontrabili in individui normali e sono prive di significato patologico;
- **con significato incerto** in quanto non ancora note o caratterizzate dalla comunità medico-scientifica. In questo caso possono essere necessari ulteriori indagini per chiarire il significato della variante.

“NEGATIVO” - Assenza di mutazioni: indica che il test non ha rilevato la presenza di mutazioni nei geni esaminati. Tuttavia è importante sottolineare che un risultato negativo non significa che il paziente ha rischio zero di sviluppare un tumore; queste persone possiedono lo stesso rischio di tumore riportato per la popolazione generale, ciò perché la maggior parte di questo genere di tumori si estrinseca in forma sporadica.

Parametri utilizzati per la refertazione delle varianti genetiche

L'analisi è mirata esclusivamente ai geni elencati in Tabella 1. Verranno refertate solo le mutazioni classificate come a significato patogenetico noto o con significato incerto, sulla base dei dati della letteratura scientifica e la classificazione presente nel database di riferimento Human Gene Mutation Database (HGMD), aggiornato alla data del prelievo. Inoltre, seguendo le indicazioni dell'American College of Medical Genetics (ACMG), sono state considerate come patogenetiche o presunte patogenetiche solo le mutazioni con un valore di Minor Allele Frequency (MAF) <5% (1000 Genomes Project), riferibile

come la frequenza di ricorrenza dell'allele meno comune all'interno della popolazione.

Target Coverage

Si intende per *Target Coverage*, il numero medio di letture (*reads*) ottenute dal sequenziamento per ciascuna base nucleotidica costituente il gene. Le varianti con una profondità di lettura (numero di *reads*) inferiore a 30X non vengono evidenziate dall'algoritmo di analisi bioinformatica.

Accuratezza del test OncoNext™ Risk Gastric

Le tecniche attuali di sequenziamento del DNA producono risultati con un'accuratezza superiore al 99%. Benché questo test sia molto accurato bisogna sempre considerare i limiti dell'esame, di seguito descritti.

Limiti del test OncoNext™ Risk Gastric

Questo esame valuta solo i geni elencati in Tabella 1, e non è in grado di evidenziare:

- mutazioni localizzate nelle regioni introniche oltre ± 5 nucleotidi dai breakpoints;
- delezioni, inversioni o duplicazioni maggiori di 20 bp;
- mosaicismi della linea germinale (cioè mutazioni presenti solo nei gameti).

Un risultato "**NEGATIVO**" - **Assenza di mutazioni** per i geni investigati non esclude la possibilità di essere portatori di una mutazione localizzata in una regione del genoma non investigata dall'esame.

E' possibile che alcune zone del proprio DNA non possano essere sequenziate o che abbiano una copertura inferiore ai limiti fissati dagli esperti di GENOMA Group per garantire un'analisi accurata delle varianti. Queste regioni non saranno quindi comprese nell'analisi qualora non superino gli standard qualitativi richiesti.

In alcuni casi, il risultato di un'analisi genomica può rivelare una variante o mutazione del DNA con un significato clinico non certo o determinabile in base alle attuali conoscenze medico-scientifiche.

L'interpretazione delle varianti genetiche si basa sulle più recenti conoscenze disponibili al momento dell'analisi. Tale interpretazione potrebbe cambiare in futuro con l'acquisizione di nuove informazioni scientifiche e mediche sulla struttura del genoma ed influire sulla valutazione stessa delle varianti.

Alcune patologie possono essere causate o regolate da più di una variante nel suo DNA in uno o più geni. Alcune di queste varianti possono non essere ancora

state identificate o validate dalla comunità scientifica e quindi non essere riportate come patogenetiche al momento dell'analisi.

Limite intrinseco della metodologia NGS utilizzata è la mancanza di uniformità di *coverage* per ciascuna regione genica analizzata. Tale limite si traduce nella possibilità, insita nelle metodiche NGS, che specifiche mutazioni dei geni selezionati potrebbero non essere state rilevate dal test.

Riferimenti Bibliografici

1. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer Stat Fact Sheets*. [April 29, 2015]. Available from: <http://seer.cancer.gov/>.
2. National Cancer Institute. [April 29, 2015]. Available from: <http://www.cancer.gov/>
3. Hampel H. Genetic testing for hereditary colorectal cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*. 2009;18(4):687-703.
4. Lipton L, Tomlinson I. The genetics of FAP and FAP-like syndromes. *Familial cancer*. 2006;5(3):221-6.
5. Petersen GM, Slack J, Nakamura Y. Screening guidelines and premorbid diagnosis of familial adenomatous polyposis using linkage. *Gastroenterology*. 1991;100(6):1658-64.
6. Pedace L, *et al*. Identification of a novel duplication in the APC gene using multiple ligation probe amplification in a patient with familial adenomatous polyposis. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008;182(2):130-5.
7. van Hattem WA, *et al*. Large genomic deletions of SMAD4, BMPR1A and PTEN in juvenile polyposis. *Gut*. 2008;57(5):623-7.
8. Chow E, Macrae F. A review of juvenile polyposis syndrome. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2005;20(11):1634-40.
9. Gallione CJ, *et al*. A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet*. 2004;363(9412):852-9.
10. Bahassi EM, *et al*. The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene*. 2008;27(28):3977-85.
11. Cybulski C, *et al*. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet*. 2004;75(6):1131-5.
12. Walsh T, *et al*. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA*. 2006;295(12):1379-88.
13. Walsh T, *et al*. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(44):18032-7.
14. Pharoah PD, *et al*. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology*. 2001;121(6):1348-53.
15. Guilford P, Humar B, Blair V. Hereditary diffuse gastric cancer: translation of CDH1 germline mutations into clinical practice. *Gastric Cancer*. 2010;13(1):1-10.
16. Jaeger E, *et al*. Hereditary mixed polyposis syndrome is caused by a 40-kb upstream duplication that leads to increased and ectopic expression of the BMP antagonist GREM1. *Nat Genet*. 2012;44(6):699-705. Epub May 6, 2012.
17. Davis H, *et al*. Aberrant epithelial GREM1 expression initiates colonic tumorigenesis from cells outside the stem cell niche. *Nature Medicine*. 2015;21(1):62-70. Epub December 1, 2014.
18. Hegde MR, Roa BB. Genetic testing for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Current Protocols in Human Genetics*. 2009;61(Unit 10.12):10.2.1-2.28.
19. Capelle LG, *et al*. Risk and epidemiological time trends of gastric cancer in Lynch syndrome carriers in the Netherlands. *Gastroenterology*. 2010;138(2):487-92.
20. Bonadona V, *et al*. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA*. 2011;305(22):2304-10.
21. Engel C, *et al*. Risks of less common cancers in proven mutation carriers with Lynch syndrome. *J Clin Oncol*. 2012;30(35):4409-15.
22. Win AK, *et al*. Colorectal and other cancer risks for carriers and noncarriers from families with a DNA mismatch repair gene mutation: a prospective cohort study. *J Clin Oncol*. 2012;30(9):958-64.
23. Jenkins MA, *et al*. Risk of colorectal cancer in monoallelic and biallelic carriers of MYH mutations: a population-based case-family study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15(2):312-4.
24. Win AK, *et al*. Cancer risks for monoallelic MUTYH mutation carriers with a family history of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2011;129(9):2256-62.
25. Vogt S, *et al*. Expanded extracolonic tumor spectrum in MUTYH-associated polyposis. *Gastroenterology*. 2009;137(6):1976-85 e1-10.
26. Rennert G, *et al*. MutYH mutation carriers have increased breast cancer risk. *Cancer*. 2012;118(8):1989-93.
27. Church JM. Polymerase proofreading-associated polyposis: a new, dominantly inherited syndrome of hereditary colorectal cancer predisposition. *Diseases of the Colon and Rectum*. 2014;57(3):396-7.
28. Palles C, *et al*. Germline mutations in the proof-reading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat Genet*. 2013;45(2):136-44.
29. Valle L, *et al*. New insights into POLE and POLD1 germline mutations in familial colorectal cancer and polyposis. *Hum Mol Gen*. 2014;23(13):3506-12. Epub February 5, 2014.
30. Eng C. Will the real Cowden syndrome please stand up: revised diagnostic criteria. *J Med Genet*. 2000;37(11):828-30.
31. Starink TM, *et al*. The Cowden syndrome: a clinical and genetic study in 21 patients. *Clin Genet*. 1986;29(3):222-33.
32. Heald B, *et al*. Frequent gastrointestinal polyps and colorectal adenocarcinomas in a prospective series of PTEN mutation carriers. *Gastroenterology*. 2010;139(6):1927-33.

33. Tan MH, *et al.* Lifetime cancer risks in individuals with germline *PTEN* mutations. Clin Cancer Res. 2012;18(2):400-7.
34. Mester JL, *et al.* Papillary renal cell carcinoma is associated with *PTEN* hamartoma tumor syndrome. Urology. 2012;79(5):1187 e1-7.
35. Hearle N, *et al.* Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. Clin Cancer Res. 2006;12(10):3209-15.
36. Lim W, *et al.* Relative frequency and morphology of cancers in *STK11* mutation carriers. Gastroenterology. 2004;126(7):1788-94.
37. Hwang SJ, *et al.* Germline *p53* mutations in a cohort with childhood sarcoma: sex differences in cancer risk. Am J Hum Genet. 2003;72(4):975-83.
38. Birch JM, *et al.* Prevalence and diversity of constitutional mutations in the *p53* gene among 21 Li-Fraumeni families. Cancer Res. 1994;54(5):1298-304.
39. Olivier M, *et al.* Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and *TP53* genotype. Cancer Res. 2003. 63(20):6643-50.
40. Gonzalez KD, *et al.* Beyond Li-Fraumeni syndrome: clinical characteristics of families with *p53* germline mutations. J Clin Oncol. 2009. 27(8):1250-6.
41. McCuaig JM, *et al.* Routine *TP53* testing for breast cancer under age 30: ready for prime time? Familial Cancer. 2011. 11(4):607-13.
42. American Congress of Obstetricians and Gynecologists Committee on Genetics. Committee Opinion No. 634: Hereditary cancer syndromes and risk assessment. Obstet Gynecol. June 2015. 125(6):1538-1543.
43. Mu W, *et al.* Sanger confirmation is required to achieve optimal sensitivity and specificity in next-generation sequencing panel testing. J Mol Diagn. 2016. 18(6):923-932.

Tabella 1:

OncoNext™ RISK Gastric: Elenco dei geni analizzati e delle patologie neoplastiche correlate

	DISEASE NAME	PhenoMIM	GENE
1	Adenomatous polyposis coli (Colorectal, duodenal, liver, thyroid, pancreatic, CNS)	175100	APC
2	Polyposis syndrome (Colorectal, stomach, pancreatic)	174900 610069	BMPRI1A
3	Endometrial carcinoma, somatic Gastric cancer, familial diffuse, with or without cleft lip and/or palate Ovarian carcinoma, somatic Breast cancer, lobular Prostate cancer, susceptibility to (Breast, gastric, colorectal)	608089 137215 167000 114480 176807	CDH1
4	Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis, type 8 Colorectal, uterine, stomach, ovarian, small bowel, hepatobiliary, urinary tract, brain, pancreatic, sebaceous	613244	EPCAM
5	Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis, type 2 Colorectal, uterine, stomach, ovarian, small bowel, hepatobiliary, urinary tract, brain, pancreatic, sebaceous	609310	MLH1
6	Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis, type 1 Colorectal, uterine, stomach, ovarian, small bowel, hepatobiliary, urinary tract, brain, pancreatic, sebaceous	120435	MSH2
7	Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis, type 5 Endometrial cancer, familial Colorectal, uterine, stomach, ovarian, small bowel, hepatobiliary, urinary tract, brain, pancreatic, sebaceous	614350 608089	MSH6
8	Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis, type 4 Colorectal, uterine, stomach, ovarian, small bowel, hepatobiliary, urinary tract, brain, pancreatic, sebaceous	614337	PMS2
9	Juvenile polyposis/hereditary hemorrhagic telangiectasia syndrome Pancreatic cancer, somatic Polyposis, juvenile intestinal	175050 260350 174900	SMAD4
10	Peutz-Jeghers syndrome Pancreatic cancer Testicular tumor, somatic Small bowel, colorectal, pancreatic, breast, ovarian	175200 260350 273300	STK11
11	Adrenal cortical carcinoma Breast cancer Colorectal cancer Hepatocellular carcinoma Li-Fraumeni syndrome Nasopharyngeal carcinoma Osteosarcoma Pancreatic cancer Basal cell carcinoma 7 Glioma susceptibility 1	202300 114480 114500 114550 151623 607107 259500 260350 614740 137800	TP53

	Breast, sarcoma, brain, adrenocortical, leukemia, gastrointestinal, genitourinary		
--	---	--	--