

## **PREDISPOSIZIONE GENETICA AL TUMORE MAMMARIO E GENI *BRCA1* E *BRCA2***

### **Coordinatori del gruppo di lavoro**

M. Zuradelli (Milano), C.B. Ripamonti (Milano), M. Autuori (Milano)

### **Comitato di revisione**

R. Aldi (Lucca), C. Andreoli (Milano), Giovanni Angiolucci, Arezzo - S. Bonvini (Rho), M. Bortul (Trieste), B. Brancato (Firenze), L. Branchini (Castellanza), A. Caramanica (Arezzo), A. Ciccozzi (L'Aquila), R. Ceccherini (Trieste), M.P. Costanzo (Catania), A. D'Amuri (Tricase), A. Fancellu (Sassari), D. Friedman (Genova), L. Galletto (Savigliano), F. Galli (Castellanza) - I. Gomasasca (Rho), W. Gatzemeier (Milano), R. Giardini (Milano), M. Lagrassa (Aviano), G. Macellari (Piacenza), P. Maddaluno (Napoli), P. Malerba (Milano), S. Perrotta (Napoli), Q. Piubello (Verona), P.C. Rassu (Novi Ligure), F. Ricci (Latina), P.A. Riccio (Imola), F. Rovera (Varese), A. Rubino (Milano), G. Santoro (Salerno), G. Scaperotta (Milano), R. Spina (Napoli), G. Tazzioli (Modena), A. Testori (Milano), R.Thomas (Napoli), U. Torchia (Messina), R. Travaglini (Milano), Cristiana Vidali (Trieste).

### **PREMESSA**

Il tumore della mammella è una patologia ad eziologia multifattoriale, alla cui base e sviluppo intervengono diversi fattori: ormonali, metabolici, ambientali, immunitari e genetici. La maggior parte dei tumori mammari sono "sporadici", ovvero insorgono in donne senza una significativa storia familiare per questa patologia. Il 15-20% circa dei casi vengono invece definiti "tumori familiari", poiché nel nucleo familiare esiste più di un componente affetto. Infine, circa il 5-10% vengono denominati "tumori ereditari". Tale denominazione è in realtà impropria in quanto non si eredita la malattia ma una predisposizione geneticamente determinata a svilupparla.

Tale suscettibilità dipende dalla presenza di varianti patogenetiche nel DNA germinale, cioè presenti in tutte le cellule dell'individuo, che determinano un rischio molto superiore a quello della popolazione generale di ammalarsi di tumore mammario. Si ricorda che il rischio di tumore mammario nelle donne nel corso della vita è circa l'8-10%. Vi sono poi particolari etnie che presentano un rischio maggiore di predisposizione ereditaria al tumore mammario (ad es. donne di etnia ebraica Ashkenazi).

Negli anni '90 sono stati identificati due geni responsabili di una parte della suscettibilità allo sviluppo di tumori mammari: il gene *BRCA1* (BReast Cancer 1) ed il gene *BRCA2* (BReast Cancer 2) situati, rispettivamente sul cromosoma 17 e sul cromosoma 13. I geni *BRCA1* e *BRCA2* sono definiti oncosoppressori, cioè capaci di regolare la proliferazione cellulare e di riparare gli eventuali danni nella

replicazione del DNA. La presenza di una variante patogenetica, cioè in grado di alterare in maniera provata la funzionalità delle proteine *brca1* o *brca2*, in uno di questi geni aumenta il rischio di sviluppare sia uno o più tumori della mammella sia un tumore degli annessi nel corso della vita. Alterazioni di questi geni sono responsabili di circa il 25% dei casi di tumore su base ereditaria della mammella e di circa il 10% dei casi di tumore su base ereditaria dell'ovaio. È stato stimato che la prevalenza nella popolazione di varianti patogenetiche in questi geni sia circa di 1 individuo su 400-500. La modalità di trasmissione delle varianti nei geni *BRCA* nelle generazioni successive è mendeliana di tipo autosomico dominante, ovvero un individuo portatore (cioè colui che presenta nel proprio DNA una variante), sia esso maschio o femmina, trasmetterà tale alterazione alla prole ad ogni gravidanza con una probabilità pari al 50%, indipendentemente dal sesso.

È difficile definire l'entità del rischio di sviluppare nell'arco della vita un tumore mammario per le donne portatrici di varianti patogenetiche nei geni *BRCA1* e *BRCA2* poiché gli studi a riguardo sono stati effettuati in popolazioni diverse, con approcci diversi (retrospettivi, prospettici) e con intervalli di confidenza variabili. Tuttavia, è verosimile stimare il rischio cumulativo a 80 anni di sviluppare un tumore mammario per le portatrici di varianti nel gene *BRCA1* al 72% circa e al 69% per le portatrici di varianti nel gene *BRCA2*. Tali varianti conferiscono inoltre un rischio aumentato di insorgenza del tumore ovarico/tubarico, che per il gene *BRCA1* è circa il 44%, mentre per il *BRCA2* il 17%.

Il rischio di tumore mammario controlaterale a 20 anni dal primo tumore è stimabile al 40% per portatrici di varianti patogenetiche nel gene *BRCA1* e al 26% per portatrici di varianti patogenetiche nel gene *BRCA2* <sup>(1)</sup>. Varianti patogenetiche in questi geni sono inoltre responsabili di un rischio incrementato di tumore mammario maschile, pari all'1-5% per varianti nel gene *BRCA1* ed al 7-8% per varianti nel gene *BRCA2* <sup>(2,3)</sup>. I dati attuali della letteratura riportano inoltre un modesto aumento di rischio per altri tipi di neoplasie nei soggetti che presentano varianti patogenetiche nel gene *BRCA1* (tumore del colon, dell'endometrio e del pancreas) e nel gene *BRCA2* (melanoma cutaneo ed uveale, tumore dello stomaco, del pancreas e della prostata) <sup>(4,8)</sup>.

Non è possibile ad oggi effettuare una stima individuale del rischio oncologico nei soggetti con varianti patogenetiche nei geni *BRCA* poiché la cancerogenesi è un processo multifattoriale a cui concorrono, oltre alla variante patogenetica che ha un ruolo preponderante in questi casi, anche altri fattori (es. ambientali, ormonali, immunologici e genetici di altro tipo) che non è possibile quantificare.

Il tumore mammario correlato ad alterazioni dei geni *BRCA* presenta spesso insorgenza in età giovanile, bilateralità e grading elevato. Nel caso specifico di tumori correlati ad alterazioni del gene *BRCA1* si possono riscontrare un'elevata conta mitotica, un'intensa risposta infiammatoria, una elevata incidenza di aspetti di tipo midollare, assenza di espressione dei recettori ormonali per l'estrogeno ed il progesterone e dell'espressione/amplificazione del gene *HER2neu*, varianti somatiche nel gene *TP53* ed espressione delle citocheratine "basal-type" (*CK5/6*, *CK14*). I tumori correlati alla presenza di varianti nel gene *BRCA2* sono invece più simili ai tumori mammari sporadici. Tuttavia possono presentare frequentemente una morfologia tubulo-lobulare e lobulare pleomorfica <sup>(9,10)</sup>.

La raccolta dell'anamnesi familiare è di fondamentale importanza per valutare la presenza di una forma di predisposizione ereditaria allo sviluppo di tumori mammari correlata ai geni *BRCA1* e *BRCA2*. Da questa emerge la presenza di tumori mammari e/o annessiali, spesso in più familiari (di I e di II grado), e diagnosticati in epoca pre-menopausale. Più raramente si riscontrano familiari di sesso maschile affetti da tumore mammario. Alla luce del fatto che i soggetti con varianti patogenetiche nei geni *BRCA* presentano un rischio molto elevato di tumore, appare evidente l'importanza di un loro corretto e tempestivo riconoscimento. A tal fine risulta fondamentale l'esecuzione di una consulenza genetica oncologica (CGO)

per valutare l'indicazione ad effettuare il test genetico e successivamente, per il commento e la gestione del risultato per il paziente stesso e per i suoi familiari. Una gestione clinica ottimale in grado di affrontare le diverse e molteplici problematiche di queste pazienti deve essere garantita da un'equipe multidisciplinare di professionisti con competenze integrate, da attuare mediante la continua e stretta collaborazione tra l'Oncologo Medico, il Genetista Medico, il Senologo e Chirurgo Plastico, il Ginecologo, il Radiologo e lo Psicologo, anche in tempi diversi rispetto alla CGO.

### **Struttura e metodologia di lavoro**

Verranno di seguito riportate le indicazioni utilizzate attualmente a livello nazionale per l'esecuzione del test genetico per la predisposizione ereditaria allo sviluppo dei tumori della mammella legata ai geni BRCA e la gestione clinica delle pazienti. Sono qui riprese:

- le proposte sulla consulenza genetica e test genetico in oncologia (Tavolo AIOM – Società Italiana Genetica Umana-SIGU- 2013, <https://www.sigu.net/>)
- le indicazioni sull'interpretazioni delle varianti di sequenza in geni di predisposizione ai tumori (SIGU, 2016)
- l'aggiornamento delle linee guida AIOM 2019 (<https://www.aiom.it/linee-guida-aiom/>)
- le raccomandazioni per l'implementazione dei test BRCA nelle pazienti con carcinoma ovarico e nei familiari a rischio elevato di neoplasia (AIOM, SIGU, SIBIOC, SIAPEC, IAP, 2019)

Allo stato attuale, non vi sono linee guida nazionali inerenti questo argomento ad eccezione delle linee guida AIOM sui tumori ereditari. Sono presenti infatti linee guida in alcune Regioni e raccomandazioni della SIGU. All'estero invece le Società Scientifiche hanno già stilato da tempo le loro linee guida (ad esempio le NCCN americane o le NICE inglesi) <sup>(11)</sup>.

Lo scopo di queste indicazioni è quello di fornire un indirizzo per ottimizzare l'identificazione dei soggetti potenzialmente a rischio per il carcinoma ereditario-familiare (che per semplicità verrà definito d'ora in avanti familiare), per definirne il rischio, le modalità e le tempistiche di sorveglianza, le misure di prevenzione e di trattamento e la gestione dei familiari.

In ogni capitolo viene riportato lo stato dell'arte dell'argomento trattato ed al termine del documento vengono elencati i concetti essenziali ad uso immediato nella pratica clinica.

In dettaglio, il documento è stato suddiviso nei seguenti capitoli:

- 1: consulenza genetica oncologica (CGO) (definizione degli elementi essenziali per selezionare i soggetti da inviare al test genetico, scopo della consulenza genetica pre e post test, criteri di eleggibilità al test genetico BRCA)
- 2: test genetico (definizione, procedure, caratteristiche del laboratorio, descrizione della metodologia utilizzata, sistema di classificazione delle varianti e interpretazione dei possibili risultati, modalità di refertazione, test genetico BRCA somatico)
- 3: misure di sorveglianza (descrizione delle metodiche di prevenzione secondaria più efficaci e della loro applicazione)
- 4: misure di riduzione del rischio (illustrazione delle misure di riduzione del rischio sia di tipo medico che chirurgico)

- 5: trattamento medico e chirurgico del carcinoma mammario ereditario (valutazione e discussione delle opzioni terapeutiche disponibili)
- 6: altri geni di suscettibilità al tumore della mammella
- 7: take home messages

## **CAPITOLO 1 - DEFINIZIONE DELLA CONSULENZA GENETICA ONCOLOGICA (CGO)**

La CGO è un processo di comunicazione condotto da un team multidisciplinare che si svolge in più momenti nel quale vengono affrontate problematiche mediche, umanitarie, scientifiche, metodologiche, psicologiche, relazionali. Il soggetto viene informato della possibilità che la malattia oncologica possa avere una base genetico/ereditaria, che potrebbe esserci un rischio per ulteriori malattie oncologiche, che potrebbero esserci delle ricadute sui familiari e sui figli e come potrebbero essere gestite tutte queste problematiche. Il soggetto che effettua una CGO deve poter collaborare attivamente durante questo iter, sia fornendo informazioni cliniche sui familiari affinché si possa definire meglio il rischio oncologico familiare, sia spiegando le sue aspettative e necessità, presenti e future. Pertanto, durante tutto il percorso di CGO, il soggetto deve essere supportato nelle scelte migliori per sé stesso, considerando sia il punto di vista medico che quello emotivo, a partire dalla possibilità di decidere se/quando effettuare il test genetico fino alla scelta delle opzioni terapeutiche/di sorveglianza disponibili e alla condivisione con i familiari dell'informazione e delle scelte di vita conseguenti.

È pertanto importante che i colloqui della CGO, che possiamo dividere in pre- e post-test genetico, si svolgano in momenti separati rispetto ad altre visite di routine, viste la delicatezza e la peculiarità degli argomenti trattati. Generalmente la tempistica di esecuzione della CGO non ha carattere d'urgenza. Tuttavia, possono esserci delle eccezioni legate a decisioni terapeutiche (medico-chirurgiche o di trattamento radiante), da valutare caso per caso con gli specialisti inviati.

### **1.1 - Fase preliminare (chi inviare alla CGO)**

In considerazione dell'importante finalità della CGO, ovvero l'identificazione della popolazione più a rischio di sviluppare una patologia oncologica, è fondamentale sensibilizzare su tale argomento tutta la classe medica, al di là della specifica specializzazione. Partendo dal presupposto che solo una piccola parte dei soggetti affetti da neoplasia mammaria avrà necessità di una valutazione genetica-oncologica, è necessario formare i Medici Specialisti ed i MMG affinché sappiano riconoscere le situazioni che realmente necessitano di tale approccio per poter indirizzare alla CGO solo quegli individui che possano effettivamente beneficiarne in termini di terapia, e/o prevenzione.

È necessaria la raccolta sia dell'anamnesi oncologica personale del soggetto (età al tumore mammario/ovarico, anche se sono passati diversi anni dalla diagnosi) sia di quella familiare (tipologia ed età d'insorgenza di neoplasie), almeno nei parenti di I-II grado (genitori, figli, fratelli e sorelle, nonni e zii). In linea generale, i soggetti che necessitano di una CGO sono quelli che hanno sviluppato un tumore mammario in età giovanile o pre-menopausale, che presentano più familiari affetti da tumore mammario (soprattutto casi pre-menopausali o bilaterali), che hanno familiari affetti da tumore ovarico/degli annessi o della mammella maschile. Anche i soggetti sani ma con familiarità per tumore mammario/ovarico con le indicazioni precedenti possono essere indirizzati alla CGO, saranno poi gli specialisti a decidere come procedere.

In secondo luogo, è opportuno raccomandare che l'indirizzamento alla CGO deve tener conto, da parte del Medico, anche delle condizioni fisiche, psicologiche e relazionali del soggetto in quel momento particolare della sua storia, e del suo grado di motivazione ad intraprendere tale percorso. Viste le forti implicazioni dal punto di vista prognostico/terapeutico e psicologico che possono insorgere a fronte di una valutazione genetica, è infatti fondamentale che la decisione all'invio in CGO sia condivisa *in primis* con il soggetto stesso, informandolo del motivo di tale visita e, brevemente, anche dei possibili risvolti (controlli clinici diversi, coinvolgimento dei familiari), sempre nel rispetto delle linee guida concordate a livello nazionale ed internazionale secondo i criteri dell'Evidence Based Medicine.

È bene comunque far presente che anche soggetti con tumore mammario che presentano più familiari con tumori in sede diversa da mammella/ovaio nello stesso ramo familiare (soprattutto tumori del colon, dello stomaco, della prostata, dell'endometrio e sarcomi, del pancreas), specialmente se insorti prima dei 50 anni, devono essere comunque inviati in CGO per valutare l'eventuale presenza di una predisposizione ereditaria allo sviluppo di tali tumori, non necessariamente correlata ai geni BRCA.

### **1.2 - Fase pre-test (1° colloquio)**

Il primo colloquio della CGO costituisce un atto medico finalizzato a:

- Spiegare il motivo dell'invio, le conoscenze sull'argomento e le aspettative del soggetto
- Revisionare la documentazione clinica (interventi pregressi, stato di malattia, patologie concomitanti)
- Ricostruire l'anamnesi familiare, considerando anche le generazioni più lontane (fino al 3° grado di parentela, sia dal ramo materno che paterno). È fondamentale per l'inquadramento della famiglia del soggetto poter visionare la documentazione clinica dei familiari riferiti affetti da neoplasie (i familiari possono far richiesta della cartella clinica del parente deceduto)
- Valutare la probabilità *a priori* di trovare una variante nei geni *BRCA*. È possibile a tal proposito utilizzare per ogni singolo caso, modelli di calcolo statistico, disponibili online, basati principalmente sull'anamnesi familiare e personale e su agli altri fattori di rischio. I più diffusi sono:
  - BRCApro (<http://www2.stat.duke.edu/~gp/brcapro.html>)
  - BOADICEA (<https://ccge.medschl.cam.ac.uk/boadicea/>)
  - IBIS (<https://ibis.iikonopedia.com/>)
  - PENN II (<https://pennmodel2.pmacs.upenn.edu/penn2/>)
  - Manchester score, Myriad II tool.

Tali modelli, che vengono periodicamente aggiornati nel tempo, si basano su algoritmi differenti estrapolati in diverse popolazioni. Pertanto, i modelli utilizzati in una popolazione potrebbero non essere adatti in un'altra. Ad esempio, i modelli BRCApro e BOADICEA hanno risultati simili nella popolazione israeliana, ma possono funzionare in maniera diversa in altre etnie <sup>(12)</sup>. Inoltre, se si utilizzassero solo tali modelli per valutare l'eleggibilità al test genetico BRCA, si potrebbe sottostimare la presenza di varianti patogenetiche se nell'anamnesi familiare venissero considerati solo familiari affetti da tumori mammari/ovarici <sup>(13)</sup>.

Per alcuni modelli anche l'età alla diagnosi ed il sesso hanno influenza sulla probabilità *a priori* di mutazione genetica <sup>(14-15)</sup>. La soglia che viene definita di "alto rischio" generalmente utilizzata con questi programmi per proporre l'indagine genetica ed indicata da linee guida internazionali è una probabilità maggiore del 10% di riscontrare la mutazione, ma può variare nei singoli Centri. Importante è però sottolineare che la "probabilità di mutazione" non è la misura del rischio genetico. Pertanto, è prassi generale utilizzare criteri di selezione per definire "l'eleggibilità" al test genetico (vedi di seguito).

Tali criteri sono stabiliti a livello dei singoli Centri sulla base principalmente delle linee guida nazionali AIOM 2018 e sui dati di letteratura e possono modificarsi nel tempo sulla base di nuove evidenze scientifiche. Tuttavia, è bene spiegare che i criteri di eleggibilità forniscono indicazioni di massima per l'invio al test genetico ma non devono comunque intendersi come assoluti. La decisione della proposta del test genetico da parte del genetista può venire valutata anche in situazioni particolari, considerando come fine ultimo l'utilità per il soggetto stesso.

- Se vengono rispettati i criteri di eleggibilità, scegliere il caso indice o probando, ovvero il soggetto da cui iniziare l'analisi genetica in quel nucleo familiare e spiegare le motivazioni. Il caso indice può essere il soggetto stesso che si presenta alla CGO o un suo familiare, individuato tramite le informazioni raccolte durante la CGO. Questa scelta rappresenta uno dei fattori più importanti per l'interpretazione corretta del risultato dell'analisi stessa e quindi del rischio genetico dell'individuo e della sua famiglia. Pertanto, è di fondamentale importanza, iniziare l'analisi partendo dal soggetto con la probabilità più alta di presentare un'alterazione genetica predisponente (es. età più giovane di insorgenza del tumore mammario o ovarico, tumore mammario bilaterale, tumore della mammella maschile).
- Illustrare i possibili risultati dell'analisi genetica, la modalità di esecuzione e i tempi necessari per la refertazione.
- Discutere il potenziale impatto psicologico (paura, angoscia, dubbi) connesso all'esecuzione dell'analisi genetica e quindi la possibilità di avvalersi di un supporto psicologico sia in fase pre che post-test.
- Spiegare le implicazioni relative ai risultati del test genetico riguardanti le opzioni di sorveglianza clinico-strumentale, di chirurgia profilattica e di farmacoprevenzione.
- Spiegare le possibili implicazioni nei confronti degli altri membri della famiglia (modalità di trasmissione dell'eventuale alterazione riscontrata dal test ai figli o presenza in altri familiari, anche senza malattia oncologica)

È bene non essere direttivi per quanto riguarda l'esecuzione del test, esponendo vantaggi e difficoltà correlati al risultato del test genetico. Qualora il paziente decida di sottoporsi a tale analisi (nella maggior parte delle situazioni), si procede alla firma del consenso informato, che deve riprendere quanto discusso durante la consulenza ed essere sufficientemente chiaro perché il paziente lo comprenda in ogni parte. Il consenso informato deve essere controfirmato da chi richiede l'analisi.

### **1.3 - Criteri di eleggibilità al test genetico per l'identificazione di varianti patogenetiche germinali nei geni BRCA1 e BRCA2**

Di seguito vengono riportati i criteri suggeriti al fine di proporre l'esecuzione dell'analisi genetica per sospetta predisposizione al carcinoma della mammella e/o degli annessi e del peritoneo.

#### Individui affetti da carcinoma della mammella senza storia familiare

- carcinoma della mammella  $\leq 40$  anni
- carcinoma della mammella + carcinoma ovarico/tubarico/peritoneale a qualsiasi età
- carcinoma della mammella bilaterale  $\leq 50$  anni
- carcinoma della mammella di tipo "triplo negativo"  $\leq 60$  anni
- carcinoma della mammella maschile a qualsiasi età
- carcinoma ovarico/tubarico/peritoneale a qualsiasi età

Individui affetti da carcinoma della mammella < 50 anni e con storia familiare:

- 1 familiare di primo grado affetto da carcinoma della mammella  $\leq$  50 anni
- 1 familiare di primo grado affetto da carcinoma della mammella bilaterale a qualsiasi età
- 1 familiare di primo grado affetto da carcinoma ovarico/tubarico/peritoneale a qualsiasi età
- 1 familiare di primo grado affetto da carcinoma della mammella maschile a qualsiasi età

Individui affetti da carcinoma della mammella > 50 anni e con storia familiare dallo stesso ramo di:

- 2 o più familiari di primo grado affetti da carcinoma della mammella a qualsiasi età
- 1 o più familiari di primo grado affetto da carcinoma ovarico/tubarico/peritoneale a qualsiasi età
- 1 familiare di primo grado affetto da carcinoma della mammella maschile a qualsiasi età

Si specifica che i familiari affetti devono essere parenti di primo grado tra loro; nel ramo paterno, zie paterne, nonna paterna e cugine (figlie di fratello del padre) vengono considerati come parenti di primo grado.

In ogni caso, individui sani o malati che presentano un familiare con variante patogenetica accertata o che facciano parte di etnie in cui la presenza di alterazioni nei geni BRCA è molto frequente (Ebrei Ashkenazi)

In alcune situazioni in cui vengono riscontrati i criteri di eleggibilità ma la scelta del caso indice è difficoltosa (per esempio per mancanza di collaborazione del familiare selezionato, paura di sottoporsi al test, non interesse, lontananza geografica) l'analisi può essere proposta ad un altro familiare, possibilmente il più prossimo possibile. Nelle famiglie con pochi parenti (figli unici, genitori figli unici), oppure nelle famiglie con molti soggetti di sesso maschile, l'offerta del test genetico può essere presa in considerazione anche se i criteri di eleggibilità non sono rispettati appieno.

L'offerta del test genetico in soggetti non affetti da neoplasia mammaria/ovarica ma appartenenti a nuclei familiari in cui sono stati riscontrati i criteri di eleggibilità al test genetico va valutata caso per caso, considerando l'effettiva utilità clinica del risultato del test genetico in termini di prevenzione per il soggetto e per i familiari.

Nei casi in cui il caso indice decida, per qualsiasi ragione, di non effettuare il test genetico, la formulazione del rischio genetico può essere effettuata *a priori*, sulla base dei dati forniti. In tal caso è necessario spiegare al paziente i limiti connessi a tale formulazione, legati fondamentalmente alla variabilità individuale, ed alla frequente imprecisione o scarsa attendibilità dei dati anamnestici familiari. In queste situazioni, il follow-up verrà offerto sulla base della storia personale e familiare. Inoltre verrà spiegato che potrà eseguire il test genetico anche successivamente.

Se un familiare di un soggetto portatore di una variante patogenetica nei geni BRCA decide di non eseguire il test genetico per la ricerca della variante familiare (test mirato), il soggetto va considerato comunque ad alto rischio per quanto riguarda la pianificazione dei controlli clinico-strumentali.

Le linee guida NCCN 2019 propongono l'esecuzione del test genetico BRCA anche in soggetti affetti da tumore del pancreas, della prostata metastatico o di grado Gleason 2, prevalentemente a scopo terapeutico. Al momento in Italia non ci sono linee guida o indicazioni che contengano anche questi tumori tra i criteri di eleggibilità al test genetico ed è comunque di difficile attuazione considerando le risorse disponibili in quest'ambito

Pertanto, la scelta di proporre il test BRCA in queste situazioni può essere valutata sulla base dell'effettiva utilità per il paziente e per la famiglia ed alle risorse disponibili.

#### 1.4 - Fase post-test (2° colloquio CGO)

Durante la CGO post-test viene spiegato il risultato del test genetico, specificando la possibilità di nuove malattie oncologiche, le implicazioni clinico-psicologiche associate, le diverse opzioni medico/chirurgiche per terapia ed il follow-up. Questo avviene per tutti i risultati del test genetico (vedi di seguito). Nel caso di riscontro di variante patogenetica, viene inoltre valutata la possibilità di coinvolgere i familiari. Obiettivo della CGO post-test è di fornire al paziente tutte le indicazioni per renderlo più consapevole di fronte a qualsiasi decisione futura.

## CAPITOLO 2 - TEST GENETICO

**2.1 - Definizione:** analisi a scopo clinico di DNA, RNA, cromosomi, proteine, metaboliti o altri prodotti genici, eseguita per evidenziare marcatori genotipici, cariotipici o fenotipici correlati con patologie ereditabili umane.

**2.2 - Finalità dei test genetici in oncologia:** i test genetici utilizzati sono di tipo predittivo, ovvero consentono di individuare la presenza di un'alterazione genetica associata ad un aumentato rischio di sviluppare uno o più tumori, ma solo in termini probabilistici.

**2.3 - Procedure, finalità e metodi di analisi:** i test per l'identificazione di una predisposizione ereditaria allo sviluppo di tumore mammario/ovarico consistono nella ricerca di varianti nel DNA costituzionale o germinale. Il campione biologico prevalentemente utilizzato per l'analisi è il sangue periferico (più raramente il tampone buccale).

**2.4 - Caratteristiche del laboratorio di esecuzione del test genetico:** i requisiti generali delle strutture che eseguono i test genetici nelle forme di predisposizione ereditaria al cancro sono quelli previsti dalle vigenti legislazioni (nazionale e regionali) in ambito di regolamentazione dei Laboratori di Genetica Medica, cui si rimanda per le specifiche indicazioni riguardanti l'organizzazione del laboratorio in termini di spazi, attrezzature e personale, la gestione della documentazione relativa ai protocolli operativi, gli indicatori di efficienza, i controlli di qualità, il trattamento dei dati sensibili. Si invia anche al documento della Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) del 20 aprile 2017: "il Laboratorio di Genetica Medica ed i requisiti per la sua direzione" (<https://www.sigu.net>)

È importante che tali Laboratori partecipino ai controlli esterni di qualità (VEQ) italiani (ISS) ed europei.

**2.5 - Metodologia:** oggi i laboratori utilizzano per l'analisi genetica dei geni BRCA le tecnologie del Next Generation Sequencing (NGS). Il DNA isolato dalle cellule nucleate (globuli bianchi) o da cellule epiteliali del cavo orale viene sottoposto a sequenziamento massivo parallelo (MPS), secondo protocolli diversi a seconda della tecnologia (le più comuni sono Illumina, Roche, QIAGEN) I dati ottenuti dalle sequenze geniche vengono analizzati con l'utilizzo di software commerciali che identificano dapprima tutte le varianti presenti nella sequenza genomica analizzata e poi, tramite un sistema di filtraggio predefinito, selezionano quelle che potrebbero avere un significato per il gene in esame.

La presenza di una variante deve essere poi confermata con una seconda metodica (sequenziamento secondo Sanger). Qualora tramite questa tecnica non dovessero essere identificate varianti, si procederà all'utilizzo di una seconda tecnica che permette di identificare grosse delezioni/inserzioni nei geni BRCA1 e BRCA2 (Copy Number Variations o CNS). La metodologia più comune è quella di Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA), oppure software che permettono di attuare sia NGS che CNV.

Tramite NGS è possibile analizzare contemporaneamente più geni di suscettibilità ai tumori, spesso utilizzando dei pannelli commerciali predefiniti. Questa procedura ha tempi d'esecuzione più brevi e costi più contenuti rispetto alle tecniche utilizzate in passato. Gli svantaggi sono fondamentalmente correlati al fatto che nei pannelli disponibili sul mercato sono compresi alcuni geni per i quali non sono ancora disponibili i dati di studi epidemiologici che ne abbiano verificato la penetranza, l'incidenza nelle varie popolazioni e l'effettiva utilità clinica. Tramite NGS sono inoltre in aumento il numero di varianti a significato clinico incerto (VUS – vedi di seguito) identificate in geni ancora relativamente poco studiati e quindi difficilmente interpretabili. Nel caso in cui l'analisi sia effettuata con pannelli di geni, è indispensabile che prevedere un percorso di CGO specifico per i geni studiati.

Nel consenso informato per l'esecuzione di pannelli di geni mediante NGS deve essere prevista la possibilità che il paziente neghi il consenso per l'analisi di alcuni geni. Indipendentemente dalla tecnica di analisi utilizzata, il laboratorio deve riportarne la sensibilità, la specificità ed i limiti nel referto.

Il test sui familiari viene eseguito mediante sequenziamento diretto del frammento di DNA in cui è localizzata la variante patogenetica che si intende accertare (già identificata nel caso indice) oppure si utilizza la metodica utilizzata per identificare CNV mirata sulla regione da indagare.

**2.6 - Sistema di Interpretazione delle varianti:** l'interpretazione del dato genetico derivante dal test spetta al laboratorio dove è eseguita l'indagine. L'utilità clinica del risultato del test genetico è infatti fortemente correlata alla corretta interpretazione delle varianti identificate che deve essere fornita dal laboratorio in maniera chiara con specifici riferimenti tecnici/bibliografici che devono essere aggiornati periodicamente nel tempo. Poiché lo spettro mutazionale dei geni *BRCA* è molto eterogeneo, è indispensabile che nel laboratorio vi sia l'expertise per interpretare qualsiasi risultato ottenuto dall'analisi genetica. Ciascun laboratorio deve attenersi e specificare le linee guida utilizzate per l'interpretazione del risultato del test.

Tra le indicazioni per l'interpretazione dei test genetici si citano quelle del 2014 pubblicate dalla SIGU in collaborazione con l'Associazione Italiana Oncologi Medici (AIOM), le linee guida del consorzio ENIGMA (Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Allele) [che](https://enigmaconsortium.org/) stila i criteri di classificazione specifici per le varianti nei geni *BRCA*, ai quali i laboratori possono far riferimento (<https://enigmaconsortium.org/>), quelle americane dell'American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Tali linee guida sono in continuo aggiornamento, in funzione dei nuovi dati di letteratura disponibili e sono utilizzate da molti laboratori in Italia e all'estero. Il sistema di classificazione delle varianti più utilizzato, redatto dal gruppo IARC (International Agency for Research on Cancer) <sup>(16)</sup> e dall'American College Medical Genetics and Genomics in collaborazione con l'Association for Molecular Pathology (ACMGG-AMP)(17), suddivide le varianti in 5 categorie con le relative probabilità di essere patogenetiche (%)

- 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)

Varianti patogenetiche o verosimilmente patogenetiche (classi 5 e 4): sono varianti in grado di generare modificazioni della struttura e/o della funzione delle proteine corrispondenti. Tali modificazioni possono introdurre siti precoci di terminazione della sintesi proteica (varianti nonsense o frameshift), modificare il normale processamento (splicing) dell'RNA messaggero, dando generalmente luogo a prodotti proteici incompleti o instabili e, conseguentemente, non più funzionalmente attivi, oppure comportare la sostituzione di un singolo aminoacido (varianti missense) con effetto sulla funzione della proteina.

Varianti benigne o probabilmente benigne (classi 1 e 2): sono associate ad un rischio oncologico estremamente basso o nullo e nella maggior parte dei casi, non vengono inserite nel referto. Il follow-up clinico deve basarsi sull'anamnesi personale e familiare.

Varianti a significato clinico incerto (VUS) (classe 3): è la classe quella più problematica perché non è possibile associare il dato genetico ottenuto ad un rischio oncologico aumentato. Si riscontrano in circa il 15% dei test BRCA e sono spesso uniche, cioè riscontrate solo in uno o pochi individui. Sono costituite dalle alterazioni nucleotidiche il cui effetto sulla funzionalità delle corrispondenti proteine non è immediatamente deducibile dalla natura delle mutazioni stesse oppure per le quali non sono disponibili sufficienti dati sperimentali o genetico-epidemiologici per una corretta interpretazione. Includono varianti missenso o piccole delezioni in-frame il cui effetto sulla struttura della proteina non può essere inferita subito, varianti (esoniche o introniche) che possono potenzialmente interferire con lo splicing dell'mRNA ma per le quali non c'è ancora un'evidenza diretta e varianti nelle regioni regolatorie. Il processo di classificazione delle varianti di classe 3 al fine di stabilire se sia possibile considerarle come quelle di classe 4-5 oppure 1-2, è molto complesso e necessita di molto tempo e di analisi integrate. A livello internazionale sono state raccolte le informazioni riguardanti molte VUS ed i dati inseriti in database ad uso pubblico. Tra i più utilizzati troviamo:

- ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)
- dbSNPs (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)
- Breast International Consortium (BIC - [www.research.nhgri.nih.gov/bic/](http://www.research.nhgri.nih.gov/bic/))
- Human Variome (<http://www.humanvariomeproject.org/>)

Infine ricordiamo il database BRCAExchange (<https://brcaexchange.org/>), che fornisce risultati rivisti e validati da gruppi di esperti (18). Tramite questi siti è possibile sapere se la VUS identificata è già stata descritta in altri soggetti e le evidenze del momento (frequenza nella popolazione generale, risultati delle analisi bioinformatiche, test di laboratorio, studi di popolazione). È importante controllare periodicamente questi siti per vedere se ci sono stati cambiamenti nella classificazione. Se nei database la VUS non è presente, si possono utilizzare dei tools bioinformatici per indagare l'effetto a livello della proteina o del trascritto, a seconda della posizione della VUS (esonica o intronica).

Nel caso di varianti missenso esoniche, i programmi di predizione *in silico*, quali:

- SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>)
- Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>)
- Align GVGD (<http://agvgd.iarc.fr/alignments.php>)

sono in grado di valutare l'effetto della sostituzione aminoacidica sulla struttura/funzione della proteina e la conservazione del residuo aminoacidico modificato a livello filogenetico. Nel caso di sospette varianti di splicing dell'mRNA (varianti introniche o nelle prime o ultime basi dell'esone), i programmi, quali:

- Drosophyla, ([https://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html))
- Spliceview (<https://omictools.com/spliceview-tool>)
- Human Splice Finder (<http://www.umd.be/HSF/>)

valutano l'effetto sul processo di splicing dell'RNA. Tuttavia, questi programmi non sempre danno risultati sovrapponibili e quindi facilmente interpretabili. Dall'insieme di queste osservazioni si può arrivare ad una probabilità di patogenicità/non patogenicità *a priori*. Si specifica tuttavia che i risultati dei tools bioinformatici non devono essere mai utilizzati da soli in ambito clinico, ovvero una VUS non deve essere classificata come patogenetica o benigna solo sulla base dei risultati *in silico*.

La probabilità *a posteriori* di patogenicità di una VUS viene raggiunta solo aggiungendo altre evidenze (test funzionali *in vitro* e modelli multifattoriali), ed è stabilita generalmente da gruppi di esperti. In particolare, i modelli multifattoriali si basano sulla likelihood ratios (LRs, ovvero sulla probabilità che il dato sia osservato in caso di variante patogenetica o non), calcolata per vari fattori che poi vengono moltiplicati insieme. I fattori considerati sono molteplici: segregazione della variante nei soggetti affetti della famiglia, co-occorrenza della variante con un'altra variante patogenetica, caratteristiche istologiche del tumore, analisi di perdita di eterozigosi, analisi caso-controllo. L'uso del modello multifattoriale ha permesso di classificare alcune varianti missenso per cui il dato *in vitro* era difficilmente ottenibile. Risulta quindi fondamentale per la corretta interpretazione delle VUS un sistema di collaborazione nazionale ed internazionale tra gruppi di esperti.

Non sempre però l'interpretazione di una VUS fornita dai Laboratori è univoca e questo può generare confusione a livello clinico sull'offerta dei controlli e del test genetico ai familiari. Sarebbe auspicabile pertanto, almeno a livello nazionale, uniformare le linee guida per l'interpretazione delle varianti in modo da poter valutare in maniera univoca il probando ed i suoi familiari, anche se indirizzati al test in Laboratori diversi.

## 2.7 - Risultati del test genetico

### Test sul caso indice:

- Presenza di variante patogenetica o probabilmente patogenetica (test "positivo" - individuo "portatore", classi 5 e 4): queste varianti sono associate ad un rischio oncologico elevato per tutta la vita per lo sviluppo di tumore della mammella e/o degli annessi/peritoneale. Tali individui non sono però necessariamente destinati ad ammalarsi. Il rischio oncologico non è infatti quantificabile nel singolo soggetto poiché non dipende esclusivamente dalla variante accertata ma anche dalla presenza concomitante di altri fattori. I soggetti "portatori" necessitano di programmi di sorveglianza clinica intensivi, in base all'età, che vanno comunque adattati alla storia oncologica personale e alla prognosi della malattia (malattia metastatica). Devono essere loro proposte le chirurgie di abbattimento del rischio a livello mammario e ginecologico. Deve essere indicata l'estensione dell'analisi ai familiari poiché figli, i fratelli/sorelle ed i genitori hanno 1 probabilità su 2 di presentare la stessa variante. Tale indagine è proponibile anche a parenti di grado più lontano.
- Test "non informativo" o "non conclusivo" (soggetto indicato come BRCAx): indica che l'analisi non ha permesso di identificare alcuna variante nei due geni con la metodica utilizzata. In questo caso, non è possibile escludere la presenza di una predisposizione allo sviluppo di neoplasie mammarie in altri geni non noti o attualmente in fase di studio, oppure la presenza di varianti in zone del gene non indagate (regioni introniche profonde, promotori, enhancers). Di fatto, anche se la selezione del caso indice è stata eseguita nella maniera più corretta ed il rischio oncologico *a priori* era alto, la maggior parte dei risultati dei test genetici BRCA ricade in questo ambito, proprio per l'eterogeneità genetica di questa malattia. A fronte di tale risultato, la valutazione del rischio oncologico e le misure di prevenzione clinico-strumentale e chirurgiche devono essere stabilite in base all'età, alla storia oncologica personale e all'anamnesi familiare.
- Varianti "di incerto significato clinico" (VUS classe 3): indica che l'analisi ha permesso di identificare una variante alla quale non è stato possibile attribuire subito un significato ad utilizzo clinico e quindi non è possibile formulare nell'immediato un rischio oncologico sulla base del dato genetico. La gestione delle pazienti con VUS (controlli clinico-strumentali e proposta di chirurgia di diminuzione del rischio) si deve basare principalmente sull'anamnesi personale ed oncologica del probando e sulla sua storia familiare. Non è indicata l'estensione dell'analisi nei familiari a scopo clinico, anche se potrebbe essere utile ai fini di ricerca (es. per analisi di segregazione).

- Varianti a scarso o nullo significato clinico (classe 1 e 2): l'analisi ha permesso di identificare varianti alleliche per le quali esistono evidenze sperimentali e/o genetico-epidemiologiche che escludono un'associazione con un significativo aumento di rischio oncologico. Pertanto, di solito non vengono riportate nel referto del test genetico.
- Polimorfismi: l'analisi ha riscontrato una o più varianti alleliche che sono molto frequenti nella popolazione generale, e che sono espressione della variabilità genetica individuale, ma che non hanno alcun effetto fenotipico. Anche queste varianti, solitamente, non vengono riportate nel referto del test genetico.

#### **Test sul familiare (test mirato):**

Il test genetico *BRCA* mirato è proponibile nei familiari (soggetti sani e malati, maschi e femmine, generalmente con più di 18 anni) di un soggetto in cui è già stata identificata una variante patogenetica. Ci possono essere due soli risultati:

- presenza della variante patogenetica familiare ("test positivo"): viene identificata la specifica variante precedentemente riscontrata in altri familiari. Il soggetto viene definito anch'esso portatore di variante patogenetica ed ha un rischio elevato di sviluppo di tumore, pertanto deve essere indirizzato ad un programma di sorveglianza/chirurgia preventiva età/sex correlato, come nei probandi.
- assenza della variante patogenetica familiare ("test vero negativo"): non viene identificata la specifica variante precedentemente riscontrata in altri familiari. In questo caso, se il soggetto è sano, il risultato riporta il suo rischio oncologico per tumore della mammella e degli annessi a livelli simili a quelli della popolazione generale di pari età e comporta un grosso beneficio psicologico. I controlli clinico-strumentali per la mammella verranno basati sull'età e sull'anamnesi personale. Esistono tuttavia situazioni che limitano la valutazione del rischio oncologico sulla base dell'esito negativo di un test mirato. E' il caso di test eseguiti in soggetti con grado di parentela lontano rispetto al caso indice. Oppure il risultato negativo può essere dovuto alla presenza di fenocopie, ovvero soggetti affetti tra i familiari ma che non hanno ereditato la mutazione familiare.

#### **Test proposto a soggetti sani come caso indice**

Nelle situazioni in cui il caso indice è rappresentato da un soggetto sano il risultato di un test completo *BRCA* è informativo solo se viene identificata una variante a significato patogenetico.

Nel caso in cui, invece, non venga identificata alcuna variante, l'interpretazione è più complessa: il risultato potrebbe infatti essere un "vero negativo", ovvero il caso indice non ha ereditato la variante eventualmente presente nel familiare affetto non testato, oppure rientrare nella categoria di "test non informativo", poiché nei familiari affetti potrebbero essere presenti varianti in geni diversi da *BRCA1* e *BRCA2*.

#### **2.8 - Modalità di refertazione**

Oltre ai dati utili per l'identificazione del soggetto in analisi e del laboratorio che ha eseguito il test (dati anagrafici del paziente, nominativo ed ente di appartenenza del medico richiedente l'analisi), i referti delle analisi genetiche devono contenere le sotto indicate informazioni necessarie per la corretta interpretazione del risultato del test:

- indicazione clinica al test
- natura del materiale biologico analizzato (DNA, RNA o altro);
- tessuto di provenienza di tale materiale (in particolare occorre specificare se si tratta di tessuto normale o tumorale);
- data di raccolta del materiale biologico in esame;

- gene/i oggetto/i dell'analisi;
- regioni geniche esaminate;
- metodiche utilizzate e loro sensibilità analitica;
- sequenza genica di riferimento (utilizzando i codici di riferimento delle banche dati genetiche);
- descrizione delle alterazioni osservate rispetto alle sequenze di riferimento, utilizzando la nomenclatura stabilita dalle linee-guida internazionali (HGVS)
- descrizione del significato funzionale dell'alterazione identificata
- segnalazione di quali varianti non vengono indicate nel referto (ad esempio polimorfismi comuni e varianti di classe 1 o 2, cioè a scarso o nullo significato clinico)
- citazione dei dati di letteratura a supporto dell'interpretazione del risultato dell'analisi e database consultati
- indicazione chiara delle linee guida utilizzate per l'interpretazione del risultato.

È utile consultare le raccomandazioni della SIGU del 10 marzo 2016: "l'interpretazione delle varianti di sequenza in geni di predisposizione a tumori: indicazioni operative per il laboratorio diagnostico" (<https://www.sigu.net/>).

### **2.9 - Test genetico su DNA tumorale**

Pazienti con varianti nei geni *BRCA* affetti da tumore ovarico possono beneficiare a livello clinico (dimostrato un aumento di DFS e OS) dell'utilizzo di farmaci della categoria dei PARP inibitori (Olaparib e Niraparib), attualmente approvati in Italia come terapia di mantenimento del carcinoma ovarico, platino sensibile, in risposta completa o parziale. In considerazione dello scopo terapeutico, è consigliato iniziare l'analisi genetica dei geni *BRCA* partendo da DNA tumorale (raccomandazioni test *BRCA* somatico SIGU, 2019).

Ad oggi non tutti i Laboratori dove normalmente si effettua il test germinale *BRCA* sono attrezzati per questa analisi, che risulta molto complessa per la qualità e la quantità del materiale tumorale disponibile e che necessita di software specifici. È bene ricordare che per la richiesta di test somatici a scopo terapeutico non è necessaria esecuzione della CGO pre-test. Tuttavia, l'identificazione di una variante a livello del tumore impone la ricerca della stessa a livello germinale. Qualora la variante sia riscontrata anche nel DNA germinale, si rende necessario l'invio del soggetto stesso e dei familiari alla CGO.

## **CAPITOLO 3 - MISURE DI SORVEGLIANZA**

La proposta di un protocollo di sorveglianza clinica per i soggetti ad alto rischio familiare deve tenere in considerazione alcuni punti essenziali:

- l'età di insorgenza del tumore della mammella si sta progressivamente spostando verso le fasce più giovani della popolazione. Tale tumore rappresenta infatti ad oggi il 41% di tutte le neoplasie diagnosticate nelle donne prima dei 50 anni, ovvero proprio nella fascia d'età in cui i programmi di screening sono di difficile attuazione e sempre dibattuti;
- il rischio dato dall'esposizione a radiazioni ionizzanti (es. esame mammografico) è più elevato nella popolazione più giovane. Gli individui portatori di varianti patogenetiche potrebbero avere maggiore suscettibilità a causa della minor capacità di riparare i danni cellulari radioindotti;
- la sensibilità dell'esame mammografico nelle mammelle più "dense", caratteristiche dell'età più giovane, è ridotta;
- alcune caratteristiche istologiche tipiche dei tumori mammari *BRCA* correlati sono l'elevata velocità di proliferazione cellulare e l'alto grado di sdifferenziamento.

Per tutti questi motivi si ritiene che i soggetti ad alto rischio familiare richiedano un protocollo di sorveglianza intensivo, anche prendendo in considerazione la proposta di procedure diagnostiche più costose in termini sia “economici” che di “rischio”, inteso come aumento dei falsi positivi (es. utilizzo della RMN mammaria).

### **3.1 - Protocollo di sorveglianza clinico-strumentale proposto nei soggetti con varianti patogenetiche nei geni BRCA:**

- Autoesame ogni 3-4 mesi dai 18 anni
- Visita senologica semestrale dai 25 anni
- Ecografia mammaria semestrale dal momento in cui la variante patogenetica viene accertata
- Mammografia annuale dai 30 ai 69 anni poi ogni 2 anni
- RMN mammaria annuale dai 25 anni

Visita ginecologica con ecografia TV e dosaggio del marcatore Ca 125 semestrali dai 30 anni. Non vi sono ancora sufficienti evidenze sull'utilità del marcatore HE4 associato al CA125 per l'identificazione precoce del tumore ovarico nei soggetti a rischio. Importante comunque ricordare che con la sorveglianza ovarica molto difficilmente si è in grado di identificare lesioni anche piccole a livello ovarico/tubarico/peritoneale e che l'indicazione nei soggetti che si avvicinano alla menopausa o che hanno concluso il loro ciclo riproduttivo è quello della chirurgia di diminuzione del rischio (RRSO).

Inoltre, anche se non vi sono delle linee guida precise, è bene consigliare anche una valutazione gastroenterologica, e per i portatori di varianti patogenetiche nel gene *BRCA2*, anche della cute e dell'occhio (melanoma cutaneo ed uveale).

Per i soggetti di sesso maschile portatori di varianti patogenetiche in *BRCA1/2* non vi sono al momento protocolli sorveglianza strumentale standardizzati. Nelle linee guida NCCN vengono consigliati l'autoesame mensile e la visita senologica annuale a partire dai 35 anni. Inoltre i controlli della prostata vengono raccomandati a partire dai 45 anni nei pazienti portatori di varianti patogenetiche in *BRCA2*, mentre nei portatori di varianti patogenetiche in *BRCA1* vengono solamente consigliati.

### **3.2 - Prevenzione primaria**

Uno stile di vita sano, basato principalmente su una dieta varia ed equilibrata, un'attività fisica regolare, l'astensione dal fumo e dall'abuso di alcool, è una condizione fondamentale ed imprescindibile per la prevenzione dai tumori e dovrebbe essere adottato sia dalle donne affette che da quelle sane con varianti patogenetiche. Utile l'invio ad ambulatori specializzati in valutazione della nutrizione e programmazione dell'attività fisica.

## **CAPITOLO 4 - INTERVENTI DI RIDUZIONE DEL RISCHIO, CHIRURGICI E MEDICI**

### **4.1 - Terapia chirurgica nelle pazienti sottoposte a test genetico**

La disponibilità di un test genetico con presenza di una variante genetica di classe 4 o 5 in una donna affetta prima dell'intervento chirurgico per tumore primario permette di discutere e pianificare sia i tempi che le modalità dell'intervento stesso.

La chirurgia mammaria nelle pazienti affette con variante patogenetica accertata implica alcune considerazioni sul tipo di intervento da proporre. La presenza di una variante patogenetica è segno, infatti, che entrambe le mammelle sono ad alto rischio di malattia, anche se ciò non è prevedibile con certezza né quantificabile con precisione. A fronte di una malattia in atto può essere ragionevole proporre alla paziente

un intervento radicale (mastectomia unilaterale) piuttosto che una chirurgia conservativa e di proporre in un secondo momento l'intervento sulla mammella controlaterale.

Questa strategia al fine di valutare i fattori prognostici della prima malattia e di concedere alla paziente il tempo necessario per elaborare i cambiamenti in atto nel suo corpo. La scelta di un doppio intervento radicale contestuale deve essere comunque discussa con la paziente in maniera esaustiva, tenendo in considerazione il suo stato psicologico ed il disagio causato dalla presenza della variante patogenetica, ma spiegando come verrà modificata l'immagine di sé e tutto quello a ciò correlato.

L'intervento conservativo seguito dalla biopsia del linfonodo sentinella/linfadenectomia ascellare e radioterapia è sempre proponibile.

Al contrario, nelle situazioni in cui è stato individuato un alto rischio genetico ma il test non è a disposizione, è possibile organizzarsi per avere il risultato prima dell'intervento, magari appoggiandosi a Strutture italiane o estere certificate che siano in grado di fornire un risultato affidabile nei tempi stabiliti per l'intervento. Contestualmente, è fondamentale che la paziente venga indirizzata tempestivamente ad un percorso di CGO, in modo che, anche se dovrà effettuare delle scelte in tempi brevi, sappia fornire un consenso informato consapevole e adeguato alla sua situazione.

La prevenzione primaria del tumore mammario e degli annessi nei soggetti con variante patogenetica accertata può essere messa in atto mediante due tipologie distinte di intervento che possono però considerarsi complementari: la chirurgia profilattica, meglio definita, chirurgia di "riduzione del rischio" (mammaria o MaRR ed annessiale o RRSO) e la farmacoprevenzione.

MaRR con ricostruzione immediata: rappresenta ad oggi la strategia terapeutica più efficace e duratura nella prevenzione dell'insorgenza del tumore della mammella controlaterale nelle donne affette e nelle donne sane; la riduzione del rischio di insorgenza di tumore mammario è circa del 90%, con raggiunta del 95% se viene eseguita anche l'RRSO. L'indicazione alla biopsia del linfonodo sentinella non trova un consenso generale. Il ruolo della MaRR, tuttavia, è tuttora dibattuto per molteplici ragioni: motivazioni psicosociali, insufficienza di prove circa la sua reale efficacia in termini di sopravvivenza globale sia nelle donne con precedente neoplasia che nelle sane e per la ormai raggiunta consapevolezza che la maggior parte delle neoplasie mammarie è oggi curabile con interventi di chirurgia conservativa.

Un'importante metanalisi pubblicata di recente ha valutato i dati di 61 studi, tutti osservazionali, che hanno arruolato 15077 donne con diversi fattori di rischio per tumore mammario e tutte sottoposte a MaRR (19). Di questi studi 21 hanno riportato i risultati di donne sottoposte a mastectomia bilaterale, evidenziando una riduzione d'incidenza di tumore mammario e di mortalità per tumore mammario, in particolar modo nelle donne con varianti patogenetiche nei geni *BRCA1/2*. Parallelamente, 26 studi hanno valutato il ruolo della mastectomia profilattica controlaterale, evidenziando un calo d'incidenza di tumore mammario nella mammella controlaterale ma nessun impatto significativo sulla sopravvivenza correlata alla medesima malattia. Un singolo studio ha riportato un impatto significativo della mastectomia profilattica controlaterale sulla sopravvivenza, ma dopo aver rivalutato l'analisi sulla base delle RRSO eseguite, tale impatto non è più risultato rilevante. Alcuni studi hanno anche indagato gli aspetti psicologici correlati a questo tipo di interventi: la maggior parte ha riportato soddisfazione riguardo alla decisione presa, anche se non sempre sono stati ottenuti risultati cosmetici soddisfacenti.

È stata inoltre registrata una significativa riduzione dell'ansia correlata al rischio di ammalarsi anche se contestualmente è stato riportato un diminuito appagamento in termini di percezione della propria immagine fisica e della propria sessualità.

A tale proposito, secondo i criteri Eusoma tale intervento dovrebbe garantire risultati eccellenti in almeno il 75% dei casi, asimmetrie in non più del 20%, complicazioni minori (infezioni, piccole aree di necrosi) e contratture capsulari in non più del 10%.

Sulla scorta di tali evidenze, a fronte di un beneficio in termini di riduzione del rischio di ammalarsi e dell'ansia ad esso correlata, vanno comunque portati all'attenzione della paziente anche i potenziali svantaggi: si tratta di una chirurgia maggiore, quindi drastica, traumatica ed irreversibile; l'esito cosmetico, anche se eseguita da chirurghi molto esperti ed abili, può deludere le aspettative in quanto può non consentire un ripristino completo della situazione originaria; possono insorgere in tempi precoci e/o tardivi alcune complicanze (ad es sovrainfezioni, la retrazione capsulare, l'insensibilità della zona, asimmetria, cicatrici evidenti); non sarà possibile l'allattamento dell'eventuale prole; potrebbe insorgere disagio psicologico e relazionale con il partner.

Bisogna sottolineare che esistono anche situazioni in cui la MaRR non trova sostegno nel test genetico ma può essere comunque discussa. E' il caso di test genetico non informativo, test con presenza di VUS o test non disponibile, se la paziente ha una storia familiare importante per tumori mammari o una mammella difficile da valutare. Infine, da valutare l'offerta di MaRR anche nei soggetti affetti da sindrome di Munchausen e disturbi psicologico/psichiatrici maggiori; in caso di rischio operatorio superiore ai benefici ottenibili, di aspettative irrealistiche da parte della donna, ed infine di prognosi di una malattia già diagnosticata.

In conseguenza di tali implicazioni un corretto approccio chirurgico è imprescindibile dalla condizione che le donne candidate prendano una decisione stabile e consapevole. A tal fine deve rendersi necessario un supporto psicologico e multidisciplinare adeguato, sia durante la fase decisionale che nei tempi successivi all'intervento, e potrebbe essere ragionevole fornire alla paziente un consenso informato che includa tutto quanto riportato in precedenza.

**RRSO:** le donne portatrici di varianti patogenetiche nei geni *BRCA1* e *BRCA2* hanno un rischio molto più elevato nel corso della vita di sviluppare un tumore degli annessi rispetto alla popolazione generale. L'istotipo più presente nelle pazienti mutate è il carcinoma ovarico sieroso ad alto grado, che rappresenta uno dei tumori più aggressivi dell'ovaio. Il rischio per tumore ovarico può arrivare a circa il 40% nelle pazienti con varianti patogenetiche nel gene *BRCA1* e al 20% nel gene *BRCA2*.

Poiché non vi sono ad oggi nuovi strumenti tecnici o marcatori biomolecolari che possano identificare un tumore ovarico ai primi stadi è fondamentale discutere, nell'ambito di un programma di prevenzione, l'intervento di RRSO che, prevedendo l'asportazione delle ovaie e delle tube sino al loro impianto nell'utero, può comportare una riduzione del rischio di tumore dell'80-85% (20-22). Se eseguito in età premenopausale, l'intervento di RRSO riduce anche il rischio di tumore mammario di circa la metà (23). E' noto che dopo un intervento di questo tipo rimanga un rischio del 5% circa di sviluppare un tumore primitivo del peritoneo (24). Non è possibile abbattere completamente il rischio di tumore poiché isole di tessuto ovarico possono essere presenti nella riflessione peritoneale (rara evenienza di carcinoma primitivo peritoneale). Attualmente l'asportazione contestuale dell'utero non è uno standard anche se l'aumento d'incidenza del tumore dell'endometrio di tipo sieroso registrato nelle pazienti *BRCA1*, soprattutto nelle donne che hanno assunto tamoxifene, andrebbe discusso con queste pazienti (25).

L'età a cui proporre l'intervento dipende dalle scelte riproduttive della persona, dalla storia familiare (presenza di tumori degli annessi), ma anche dal gene coinvolto. Il rischio di sviluppare questi tumori aumenta in maniera sensibile dai 30-35 anni per le pazienti con alterazione nel gene *BRCA1* raggiungendo il

picco tra i 50 ed i 59 anni e dai 45-50 per il gene BRCA2, con picco a 60-69 anni. Pertanto, l’RSSO può essere proposta a partire dai 35-40 anni o comunque dopo che non vi è più il desiderio di prole.

Sono inoltre in corso protocolli di studio che prevedono un primo intervento di salpingectomia (è stato infatti dimostrato che i tumori annessiali nelle pazienti BRCA mutate hanno origine nelle tube) e successivamente di ovariectomia, al fine di ritardare l’entrata in menopausa, ma va ricordato che la salpingectomia non è protettiva nei confronti del tumore mammario, non è risolutiva e la paziente dovrebbe affrontare il rischio anestesilogico due volte.

Si segnala che una determinata percentuale di invalidità civile per la menomazione permanente di organi, qualora richiesta, verrà riconosciuta sia alle donne sane che malate che si sottoporranno alla chirurgia profilattica (comunicazione tecnico scientifica INPS del 13.02.19 indirizzata a tutte le commissioni medico-legali).

#### 4.2 - Farmacoprevenzione

Sin dalla fine degli anni 70 diverse molecole, naturali e sintetiche, sono state utilizzate nell’ambito di protocolli clinici sperimentali per valutarne l’efficacia, in termini di prevenzione, in particolari sottogruppi di pazienti: individui sani ad alto rischio di sviluppare un tumore nel corso della vita, soggetti con lesioni precancerose, pazienti a rischio di sviluppare un secondo tumore durante il follow up di una pregressa neoplasia. Un particolare target in questo settore è rappresentato dai soggetti sani ad alto rischio familiare, per i quali la possibilità di usufruire di tali molecole può effettivamente costituire una valida strategia preventiva.

È noto dalla letteratura che i tumori mammari correlati a varianti patogenetiche nel gene BRCA1 sono per circa il 90% non endocrino responsivi; al contrario i tumori mammari correlati a varianti patogenetiche nel gene BRCA2 sono per l’80% ormonosensibili. In considerazione di tale dato alcuni studi di farmacoprevenzione hanno valutato l’effetto protettivo di diverse molecole definite SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators), quali il tamoxifene e il raloxifene, per la prevenzione del tumore mammario. Una metanalisi pubblicata da Cuzick *et al.* nel 2013 ha analizzato i dati di 9 studi randomizzati che hanno comparato l’assunzione di un SERM versus placebo in donne non affette da tumore mammario, confermando una riduzione globale del 38% d’incidenza di questa neoplasia (maggiormente evidente nei primi 5 anni) a fronte di un significativo rialzo del rischio di eventi tromboembolici [Odds Ratio 1.73 (95%CI 1.47 e 2.05)]<sup>(26)</sup>.

Tamoxifene: Il tamoxifene, farmaco ben conosciuto per il trattamento adiuvante dei tumori ormonoresponsivi, è stato ampiamente studiato anche in altre tipologie di pazienti, come ad esempio le donne sane ad alto rischio e le pazienti con carcinoma intraduttale (DCIS, ductal carcinoma in situ). Quattro studi di fase III hanno riportato i risultati più significativi: NSABP P-1, Royal Marsden, Studio Italiano di Prevenzione con Tamoxifene ed IBIS 1. Il primo studio ha portato nel 1998 alla registrazione da parte dell’FDA del tamoxifene come farmaco di prevenzione nelle donne classificate ad alto rischio tramite il modello di Gail. Lo studio ha confermato, infatti, una riduzione di rischio di tumore mammario invasivo del 49% ( $p < .00001$ ), di tumore non invasivo del 50% ( $p < .002$ ) ed in generale dei tumori ormonoresponsivi del 69%. Non è stata evidenziata alcuna significativa diminuzione d’incidenza dei tumori non ormonosensibili.

Di contro, il farmaco ha provocato, soprattutto nelle donne in post menopausa, un’aumentata incidenza di carcinomi dell’endometrio e di eventi tromboembolici<sup>(27)</sup>. In merito al secondo trial sono stati pubblicati i dati ad un follow up mediano di 20 anni: essi non hanno dimostrato una riduzione significativa del rischio di tumore mammario durante la fase di trattamento, bensì in fase post-terapia<sup>(28)</sup>. Parallelamente lo Studio

Italiano, che ha randomizzato donne sane isterectomizzate a tamoxifene vs placebo, ha confermato nei due gruppi, ad un follow up mediano di 11 anni, un'incidenza simile di tumore mammario nelle pazienti sottoposte ad ovariectomia bilaterale e nelle donne a basso rischio di neoplasia ormonosensibile, mentre ha riportato una riduzione d'incidenza nelle donne ad alto rischio sottoposte a tamoxifene (RR 0.24, 95%CI 0.10-0.59) <sup>(29)</sup>.

Anche in questo trial il gruppo di pazienti sottoposte a tamoxifene ha sviluppato più frequentemente effetti collaterali (vampate di calore, disturbi genito/urinari, ipertrigliceridemia, eventi tromboembolici ed aritmie cardiache) rispetto al gruppo placebo. Infine, lo studio IBIS 1, ad un follow up mediano di 16 anni, ha confermato un effetto preventivo di tamoxifene costante nel tempo nei confronti del carcinoma duttale in situ ed invasivo ormonosensibile <sup>(30)</sup>. Oggi vi è dunque prova che il tamoxifene è in grado di ridurre il rischio di sviluppare un tumore mammario ormonoresponsivo, anche se i dati relativi alle donne con varianti patogenetiche nei geni *BRCA1/2* sono talmente limitati che non è possibile confermare questo dato anche nel loro specifico setting. Una metanalisi pubblicata nel 2015 e recante i risultati di 4 studi sull'utilizzo di tamoxifene in donne *BRCA* mutate e già affette da tumore mammario unilaterale ha evidenziato una riduzione statisticamente significativa dell'incidenza di tumore mammario controlaterale, ma il dato sarà da confermare con ulteriori studi <sup>(31)</sup>.

In Italia al momento, tramite la determina AIFA del 29.11.17, il tamoxifene è stato inserito nella lista dei farmaci erogabili a carico del Sistema Sanitario Nazionale per la prevenzione del carcinoma mammario nelle donne considerate ad alto rischio, ovvero con un rischio di malattia  $\geq 1.66\%$  secondo il modello di Gail nei successivi 5 anni, o con un rischio  $>8\%$  a 10 anni nella decade 40-50 anni o  $>30\%$  per tutta la vita secondo Tyrer-Cuzick.

Raloxifene: i primi studi che hanno valutato l'impiego del raloxifene come farmaco preventivo nei confronti del tumore mammario sono stati il MORE (32) ed il successivo CORE (33): entrambi, ad un follow up di 8 anni, hanno confermato nel gruppo di trattamento una riduzione d'incidenza del tumore mammario invasivo del 66% (HR 0.34, 95% CI 0.22-0.50) e delle forme ormonosensibili del 76% (HR 0.24, 95% CI 0.15-0.40). Successivamente lo studio STAR (34), un ampio trial di prevenzione primaria in donne in postmenopausa ad alto rischio secondo il modello di Gail o per precedente carcinoma lobulare in situ, ha confrontato l'assunzione di tamoxifene versus raloxifene.

A 6 anni di follow up mediano il trial ha evidenziato un'efficacia minore e meno durata del raloxifene nella prevenzione dei tumori mammari invasivi, ma con uno spettro di tossicità inferiore, in termini soprattutto di neoplasie uterine ed episodi tromboembolici. In Italia al momento, tramite la determina AIFA del 29.11.17, il raloxifene è stato inserito nella lista dei farmaci erogabili a carico del Sistema Sanitario Nazionale per la prevenzione del carcinoma mammario nelle donne considerate ad alto rischio, ovvero con un rischio di malattia  $\geq 1.66\%$  secondo il modello di Gail nei successivi 5 anni, o con un rischio  $>8\%$  a 10 anni nella decade 40-50 anni o  $>30\%$  per tutta la vita secondo Tyrer-Cuzick.

Inibitori dell'aromatasi (exemestane ed anastrozolo): largamente utilizzati nel trattamento delle pazienti già affette da tumore mammario, sono stati valutati fondamentalmente solo in due importanti studi di farmacoprevenzione nelle donne ad alto rischio in postmenopausa, rispettivamente il MAP.3 <sup>(35)</sup> e l' IBIS II <sup>(36)</sup>: il primo ha confermato una riduzione del rischio di incidenza annuale del 65% a fronte di uno spettro di tossicità accettabile, il secondo ha mostrato, dopo una mediana di follow up di 5 anni, un'incidenza di tumore mammario del 2% nel gruppo anastrozolo versus 4% nel gruppo placebo (HR 0.47, 95% CI 0.32, 0.68:  $p < 0.0001$ ). Gli effetti collaterali, in particolare a carico dell'apparato muscoloscheletrico e vascolare, si sono presentati più frequentemente nel gruppo sottoposto a terapia. Al momento queste due molecole non hanno ricevuto l'approvazione FDA per l'utilizzo nell'ambito della prevenzione al tumore mammario.

Fenretinide, o N-(4idrossifenil) retinamide (4-HPR), è un retinoide sintetico che tende a concentrarsi in maniera elettiva proprio a livello della ghiandola mammaria, rappresenta un'altra molecola di potenziale interesse nella chemioprevenzione del tumore mammario. A partire dagli anni '80 Veronesi *et al.* hanno condotto uno studio di fase III in 2972 pazienti con una storia di tumore mammario (stadio I), non sottoposte a trattamenti medici adiuvanti, randomizzate a fenretinide 200 mg/die per 5 anni versus osservazione. L'analisi, ad un follow up mediano di 8 anni, ha dimostrato, nelle donne in terapia ed in età premenopausale, una riduzione significativa sia di recidive locali che di incidenza di carcinoma ovarico. Successivi risultati, ad un follow-up di 15 anni, hanno poi confermato l'efficacia del farmaco in premenopausa, con una riduzione globale del 38% di incidenza di secondo tumore, più evidente nelle donne sotto i 40 anni (riduzione del 50%), sia per i tumori ER-positivi che gli ER-negativi.

I principali limiti all'impiego in chemioprevenzione di tale farmaco rimangono comunque la tossicità [soprattutto a livello muco-cutaneo (secchezza e desquamazione), epatico (alterazioni enzimatiche), biochimico (ipertrigliceridemia) e visivo (ritardo dell'adattamento alla visione notturna)] e la necessità di assumere contemporaneamente un contraccettivo per il potenziale effetto teratogeno<sup>(37)</sup>. Nel 2011 è stato avviato uno studio clinico di fase III randomizzato tra fenretinide 200 mg/die per 5 anni versus placebo nelle donne comprese nella fascia di età dai 20 ai 46 anni, ad alto rischio genetico o BRCA mutate ma il trial è stato interrotto precocemente nel 2016 per arruolamento insufficiente. In conclusione, in considerazione della mancanza di dati certi circa l'efficacia, l'utilizzo della fenretinide come farmaco di prevenzione non è attualmente indicato dalle principali linee guida internazionali.

L'uso dei contraccettivi orali viene indicato in diversi studi come protettivo nei confronti dello sviluppo di tumore ovarico nelle pazienti con varianti patogenetiche nei geni BRCA<sup>(38)</sup> e sembra non incrementare il rischio di tumore mammario<sup>(39b)</sup>.

Va sottolineato comunque che, al di là dei risultati incoraggianti di questi studi, la chemioprevenzione non può essere attualmente considerata un'alternativa alla prevenzione primaria ma piuttosto un suo complemento.

## **CAPITOLO 5 - LA TERAPIA MEDICA NELLE PAZIENTI AFFETTE CON VARIANTI PATOGENETICHE NEI GENI BRCA**

### **5.1 - Trattamento chemioterapico**

Il trattamento delle pazienti affette da tumore mammario correlato alla presenza di varianti patogenetiche non differisce sostanzialmente, ad oggi, da quello adottato nelle pazienti della popolazione generale. La maggior parte dei tumori BRCA1 correlati presenta un quadro abbastanza tipico, caratterizzato da un alto grading, dalla negatività dei recettori estro-progestinici e dalla assenza di amplificazione c-erb2. Queste caratteristiche definiscono in genere tumori d'aggressività spiccata. Tuttavia, allo stato attuale, la prognosi di questi tumori non appare significativamente peggiore rispetto a quelli sporadici, e pertanto non è indicato un comportamento terapeutico più aggressivo basato solo sulla presenza di un alto rischio familiare (40,41). Negli ultimi anni è stato però evidenziato come l'utilizzo di chemioterapia in fase neoadiuvante con platino derivati possa incrementare il tasso di risposta patologica completa in pazienti BRCA mutati (42)

### **5.2 - PARP inibitori nel tumore mammario.**

Da alcuni anni sono in fase di studio i Poli ADP-ribosio polimerasi (PARP) Inibitori, molecole che sfruttano l'incapacità delle cellule con variante patogenetica nei geni del riparo del DNA a correggere i danni indotti

da chemioterapici, in particolare i derivati del platino. Tra questi, l'Olaparib è stato nel 2018 approvato dall'FDA come monoterapia nel trattamento delle pazienti *BRCA* mutate e tumore mammario metastatico HER2 negativo, già sottoposte a chemioterapia in qualsiasi setting. Tale approvazione è avvenuta sulla base dei risultati dello studio OlympiAD, dove 302 pazienti *BRCA* mutate con tumore mammario metastatico HER2 negativo sono state randomizzate a olaparib vs trattamento chemioterapico a scelta del medico (capecitabina, vinorelbina o eribulina). Lo studio ha confermato un vantaggio in termini di sopravvivenza libera da progressione (7.0 vs 4.2 mesi) in favore di Olaparib ma ad una successiva analisi non è stato evidenziato un vantaggio in termini di sopravvivenza globale (43). In Italia non vi è ancora una registrazione di Olaparib per il tumore mammario quindi la somministrazione è prevista solo nell'ambito di protocolli.

### 5.3 - PARP inibitori nel tumore annessiale

1. Olaparib è stato approvato nel 2014 dall'EMA (European Medicines Agency) come monoterapia per il trattamento di mantenimento di pazienti con recidiva platino-sensibile di carcinoma ovarico epiteliale sieroso di alto grado, di carcinoma alle tube di Falloppio o carcinoma peritoneale primario, *BRCA* mutato (variante patogenetica nella linea germinale e/o variante patogenetica somatica) che rispondono (risposta completa o parziale) alla chemioterapia a base di platino <sup>(44)</sup>.

In Italia l'AIFA ha confermato tale indicazione, specificando che tale trattamento deve essere intrapreso e monitorizzato da un medico specializzato nella somministrazione di farmaci antitumorali e che il test deve essere eseguito c/o un laboratorio specializzato e che utilizzi metodologie di analisi validate. Da notare che in tale situazione in cui il test genetico è chiesto in prima istanza a scopo terapeutico, in seconda istanza, se positivo, può avere anche ripercussioni sui familiari.

2. Niraparib è disponibile in Italia come monoterapia per il trattamento di mantenimento di pazienti adulte con carcinoma ovarico epiteliale sieroso, carcinoma delle tube di Falloppio o carcinoma peritoneale primario, di grado elevato, recidivato, sensibile al platino, che stiano rispondendo (risposta completa o parziale) alla chemioterapia a base di platino, indipendentemente dallo stato mutazionale. Tale approvazione si basa sui risultati dello studio NOVA/ENGOT-OV16 dove la somministrazione di niraparib vs placebo ha statisticamente migliorato la sopravvivenza libera da progressione sia nella coorte delle pazienti *BRCA* mutate (HR 0,27; IC\* al 95 % 0,173-0,410;  $p < 0,0001$ ) che non mutate (HR 0,45; IC\* al 95 % 0,338-0,607;  $p < 0,0001$ ) <sup>(45)</sup>.

Nel corso del 2018 l'EMA ha poi approvato l'utilizzo di Olaparib indipendentemente dallo stato mutazionale ed un'ulteriore molecola, Rucaparib, come monoterapia per pazienti adulte con carcinoma ovarico epiteliale di alto grado, delle tube di Falloppio o peritoneale primario con variante patogenetica di *BRCA* (germinale e/o somatica), platino sensibile, in recidiva o progressione, precedentemente trattate con due o più linee chemioterapiche a base di platino e che non sono idonee a tollerare ulteriore chemioterapia a base di platino (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rubraca>). Tale approvazione si è basata sui dati dello studio ARIEL 2, mentre successivamente l'indicazione è stata ampliata a terapia di mantenimento di pazienti adulte con carcinoma ovarico epiteliale sieroso, carcinoma delle tube di Falloppio o carcinoma peritoneale primario, di grado elevato, recidivato, sensibile al platino, che stiano rispondendo (risposta completa o parziale) alla chemioterapia a base di platino <sup>(46)</sup>.

## CAPITOLO 6 - ALTRI GENI DI SUSCETTIBILITÀ ALLO SVILUPPO DEL TUMORE MAMMARIO

La predisposizione allo sviluppo di tumore mammario può essere correlata, più raramente, ad alterazioni in geni diversi da *BRCA1* e *BRCA2*. Il rischio relativo di sviluppo di tumore mammario per varianti patogenetiche in questi geni può essere considerato alto (OR >5), medio (OR <5 e >2) o basso (OR <2). Tra i

primi è bene ricordare i geni *TP53*, *PTEN*, *SKT11*, *CDH1* e *PALB2*, che conferiscono, oltre al rischio di tumore mammario, anche quello specifico per altri tipi di tumore. Tra i geni che conferiscono un rischio moderato, possiamo evidenziare *ATM*, *FANCM*, *REQL4*, *BARD1*, *CHEK2*. Infine, è stato individuato un gruppo numeroso di geni le cui varianti, molto frequenti nella popolazione generale, agendo con effetto sinergico, conferiscono solo un lieve aumento di rischio di tumore mammario, ma per i quali al momento, non sussiste indicazione all'utilizzo clinico <sup>(47)</sup>

I dati raccolti durante la CGO, come la presenza di altre neoplasie oltre al tumore mammario/ovarico nel paziente stesso e/o nei suoi familiari, la presenza di specifiche lesioni (ad esempio tricolemmomi o lipomi, lesioni amartomatose dell'intestino) o un esame istologico del tumore mammario indicativo di istotipo lobulare, sono elementi che possono orientare lo specialista sull'eventuale proposta di approfondimenti genetici per altri geni. Ad esempio:

- la presenza di sarcomi, tumori cerebrali e del surrene, leucemie può richiedere l'analisi del gene *TP53*, responsabile della sindrome di Li Fraumeni

- la presenza di tumori dell'endometrio e della tiroide, può richiedere analisi del gene *PTEN*, responsabile della sindrome di Cowden

- la presenza di carcinoma lobulare della mammella e tumore gastrico diffuso può richiedere analisi del gene *CDH1*, responsabile del cancro gastrico ereditario diffuso

- la presenza di tumore della cervice uterina e dell'ovaio con istotipo a cellule della granulosa può richiedere l'analisi del gene *STK11* responsabile della sindrome di Peutz-Jeghers

Le varianti patogenetiche identificate in questi geni sono però estremamente rare, ma oltre a comportare rischio tumorale in altri organi o apparati, possono coinvolgere diverse fasce d'età (anche infantile) oppure rendere i tessuti maggiormente sensibili a trattamenti radianti (minor capacità di riparare i danni cellulari radio-indotti, soprattutto per alterazioni patogenetiche nel gene *TP53*).

Una particolare attenzione è di recente stata posta sul gene *PALB2*. E' incluso tra i geni che conferiscono un alto rischio di tumore mammario (OR fino a 7.46) <sup>(48)</sup>. Varianti patogenetiche in questo gene sono rare, con frequenza variabili nelle popolazioni da 0.1% a 1.5%. *PALB2* interagisce con i geni *BRCA* nel percorso di riparazione di danni del DNA. Varianti patogenetiche con perdita di funzione della proteina sono state riscontrate in pazienti con tumori mammari pre-menopausali, tumori bilaterali <sup>(49)</sup>, tumori di tipo triplo negativo <sup>(50)</sup> e nel carcinoma infiammatorio <sup>(51)</sup>. Alcuni studi hanno anche evidenziato varianti patogenetiche in famiglie con caratteristiche simili alle famiglie con varianti nel gene *BRCA2* <sup>(52)</sup>.

Di fatto, il rischio di sviluppo di tumore mammario associato al gene *PALB2* varia non solo per fascia d'età ma anche in dipendenza della storia familiare, arrivando al 58% a 70 anni per donne che hanno due familiari affette da tumore mammario prima dei 50 anni <sup>(53)</sup>. Tale rischio è sovrapponibile al rischio di sviluppo di tumore mammario in donne con varianti patogenetiche nel gene *BRCA2*, almeno per alcune sue varianti descritte. Infine, è stata notata un'associazione tra varianti patogenetiche nel gene *PALB2* e tumori del pancreas. Le linee guida americane NCCN forniscono indicazioni per i controlli clinico-strumentali e per l'offerta di chirurgia profilattica mammaria in presenza di varianti patogenetiche di *PALB2*. In considerazione dell'alto rischio per tumore mammario, l'offerta del test per la ricerca di varianti patogenetiche in questo gene può essere ragionevolmente indicata nelle famiglie con assenza di riscontro di varianti nei geni *BRCA*.

Nel caso di riscontro di varianti in geni diversi da *BRCA1* e *BRCA2*, l'attivazione di un piano di prevenzione/cura oncologica è più complesso in quanto non vi sono ancora protocolli standardizzati di sorveglianza e di chirurgia profilattica, almeno a livello nazionale. A livello internazionale invece le linee guida NCCN, ad esempio, forniscono indicazioni per la gestione clinica ai test genetici per molti di questi geni ([https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/default.aspx](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx)). Si segnala l'indicazione a chirurgia mammaria profilattica anche nelle donne portatrici di varianti patogenetiche nei geni *TP53*, *PTEN*, *CHD1* e *PALB2*.

Inoltre, non è da sottovalutare l'impatto emotivo determinato della presenza di una variante patogenetica in questi geni. Pertanto, l'utilità di tali test deve essere valutata in base all'impatto clinico nel singolo individuo e deve essere garantito il sostegno da parte di un'equipe che si faccia carico delle diverse problematiche connesse ad un eventuale risultato positivo. In questo ambito, è importante sottolineare come sia certamente auspicabile che i laboratori che eseguono i test genetici in ambito oncologico mantengano stretti rapporti di collaborazione con i laboratori di ricerca e con i centri di CGO in considerazione delle diverse problematiche che risultano tuttora aperte in questo particolare settore della medicina. Questo tipo di interazione, infatti, risulta cruciale per permettere l'avanzamento delle conoscenze nel settore e, conseguentemente, implementare l'utilità clinica, in particolare in termini di predittività, dei test genetici.

L'utilizzo di pannelli di geni mediante NGS ha permesso di condurre studi in popolazioni numerose di pazienti con tumore mammario con test genetico BRCA negativo. Questi pannelli includono geni diversi tra studio e studio, tra i quali anche geni a penetranza moderata. Data la rarità delle varianti individuate nei singoli geni, la dimensione del rischio oncologico ad essi connessa è stata valutata solo in pochi studi. Inoltre, le VUS riscontrate in geni ancora poco studiati rendono complicato l'utilizzo clinico. Anche per lo studio di questi geni sono stati fondati Consorzi di esperti internazionali. Pertanto la possibilità di utilizzare in clinica pannelli di geni da analizzare mediante NGS deve essere valutata in base alle risorse disponibili. Sarebbe auspicabile che tali pannelli contenessero geni per i quali sia già stato riconosciuto un impatto clinico per il paziente.

Un'ultima considerazione va fatta ancora sugli studi effettuati con pannelli di geni ed NGS in pazienti con tumori mammari non selezionati. Quello che sta emergendo è che il numero di soggetti portatori di varianti germinali, comprese quelle nei geni *BRCA1* e *BRCA2* è superiore a quanto atteso e risulta indipendente dalla storia familiare e dai criteri di selezione utilizzati in consulenza genetica. E' tuttavia prematuro pensare attualmente di poter eseguire a scopo clinico-terapeutico un test genetico nella nostra popolazione generale considerando le risorse disponibili in termini economici e strutturali (costo del test genetico e presenza di centri di CGO sul territorio nazionale).

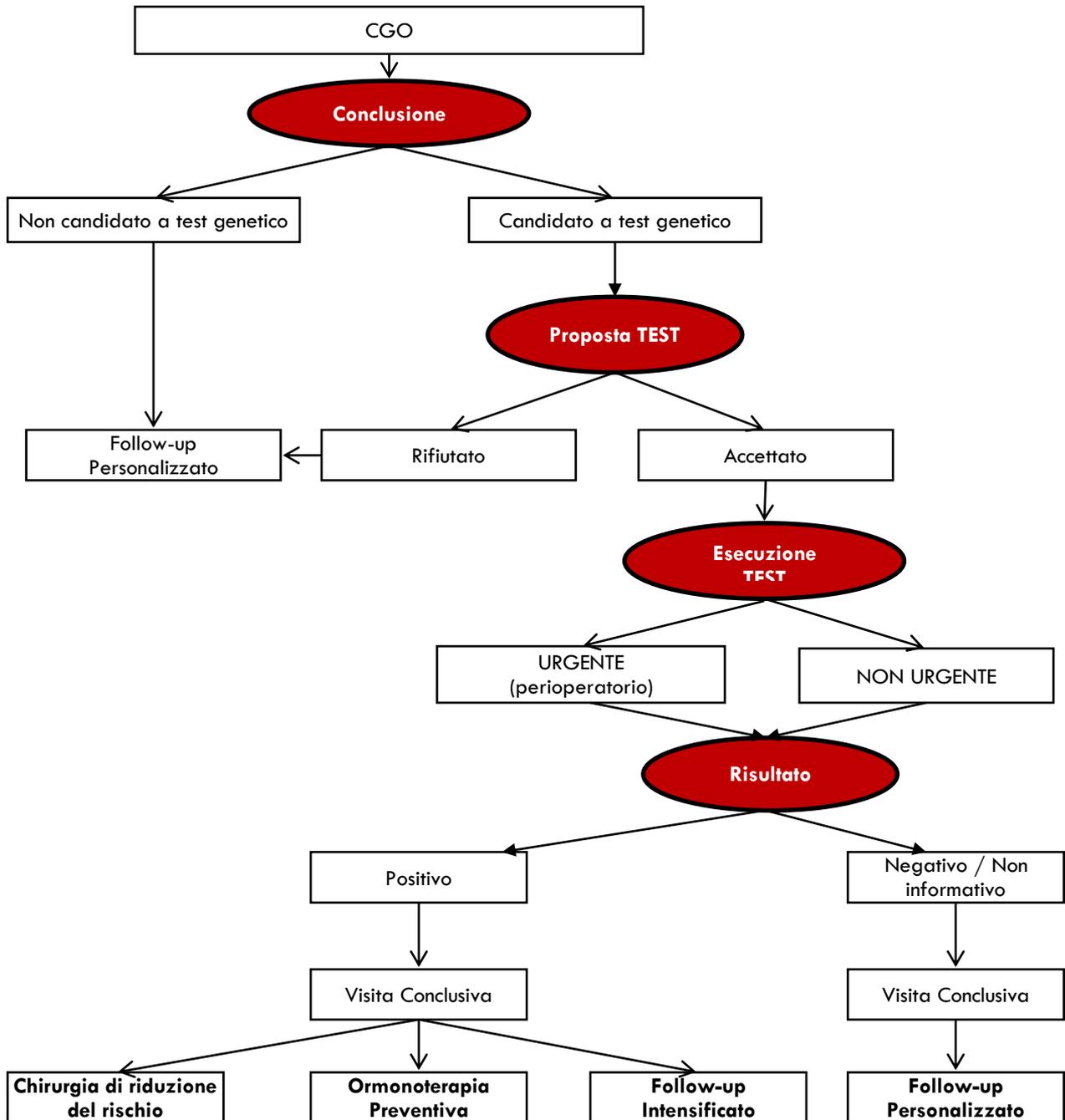
## **7. TAKE HOME MESSAGES**

- L'esecuzione dei test genetici in oncologia deve essere subordinata alla CGO
- Durante tutto il percorso di CGO il paziente deve essere supportato nella scelta delle decisioni migliori da intraprendere per sé stesso ed i suoi familiari; lo specialista in CGO non deve essere direttivo nei confronti dell'esecuzione dell'analisi genetica
- I MMG ed i Medici Specialisti devono essere in grado di riconoscere i soggetti che necessitano di CGO valutando età di insorgenza malattia (giovanile, pre-menopausale) e familiarità
- Il caso indice da cui iniziare l'analisi genetica deve essere l'individuo a più alto rischio genetico nella famiglia, anche se non è il soggetto giunto in CGO

- Il laboratorio deve fornire l'interpretazione del test genetico sulla base alle informazioni scientifiche più recenti ed essere sempre aggiornato
- La gestione clinica del risultato dell'analisi genetica deve essere affidata ad un'equipe multidisciplinare composta da specialisti con competenze integrate
- Il soggetto con test genetico che evidenzia una variante patogenetica dovrà seguire un protocollo di sorveglianza intensivo e la discussione di misure di chirurgia profilattica a livello mammario ed ovarico
- E' da considerare che la chemioterapia neoadiuvante a base anche di sali di platino ha determinato un incremento dei tassi di risposte patologiche complete
- La chirurgia profilattica mammaria ed annessiale deve essere proposta a tutte le donne con variante patogenetica in quanto è la misura più efficace nel ridurre il rischio di insorgenza di tumore mammario/annessiale (sempre considerando prognosi ed età della paziente)
- La farmacoprevenzione non può essere attualmente considerata un'alternativa alla prevenzione primaria ma piuttosto un suo complemento.
- Deve essere considerata la probabilità di presenza di predisposizione ereditaria al tumore della mammella anche in situazioni in cui non c'è una familiarità significativa per tali neoplasie ma nel nucleo familiare sono presenti altri tipi di tumori (in particolare sarcomi, tumori colon/stomaco, endometrio, pancreas), soprattutto prima dei 50 anni
- Lo studio di pannelli di geni può essere indicato a scopo clinico
- L'organizzazione dei Centri in cui viene effettuata la CGO è variabile da Regione a Regione ed anche all'interno della stessa Regione. Ciò dipende dall'organizzazione della sanità locale e dalle risorse disponibili. Sarebbe auspicabile che in tutte le Regioni vi fosse un accesso semplice ai Centri di CGO. Inoltre, come già fatto in alcune Regioni, sarebbe necessario che venissero utilizzate le risorse SSN per l'offerta a titolo gratuito delle sorveglianza clinico-strumentale delle donne sane con variante patogenetica nei geni BRCA, da estendersi anche agli uomini e anche per la chirurgia profilattica.

Sarebbe pertanto auspicabile che con questo documento venissero comprese e rese esplicite tutte le problematiche relative agli individui con varianti genetiche, in modo da avere la possibilità di intervenire, oltre che sulle problematiche umane, psicologiche, genetiche e gestionali di tali soggetti, anche sulle risorse economiche da indirizzare ai tumori mammari ereditari.

**PERCORSO PAZIENTE CON SOSPETTA EREDITARIETÀ PER CARCINOMA MAMMARIO.**



## BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Tai YC, Domchek S, Parmigiani et al. Breast cancer risk among male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99:1811;
3. Evans DG, Susnerwala I, Dawson J, et al. Risk of breast cancer in male BRCA2 carriers. *J Med Genet*. 2010;47:710.
4. Oh M, Alkushaym N, Fallatah S, et al The association of BRCA1 and BRCA2 mutations with prostate cancer risk, frequency, and mortality: A meta-analysis. *Prostate*. 2019;79(8):880-895. doi: 10.1002/pros.23795. Epub 2019 Mar 22.
5. Oh M, McBride A, Yun S, et al. BRCA1 and BRCA2 Gene Mutations and Colorectal Cancer Risk: Systematic Review and Meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2018;110(11):1178-1189. doi: 10.1093/jnci/djy148.
6. Lee YC, Milne RL, Lheureux S, et al. Risk of uterine cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Eur J Cancer*. 2017;84:114-120. doi: 10.1016/j.ejca.2017.07.004. Epub 2017 Aug 10.
7. Mersch J, Jackson MA, Park M, et al. Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian. *Cancer*. 2015;121(2):269-75. doi: 10.1002/cncr.29041. Epub 2014 Sep 15.
8. Moran A, O'Hara C, Khan S, et al. Risk of cancer other than breast or ovarian in individuals with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Fam Cancer*. 2012;11(2):235-42. doi: 10.1007/s10689-011-9506-2.
9. Spurdle AB, Couch FJ, Parsons MT, et al. Refined histopathological predictors of BRCA1 and BRCA2 mutation status: a large-scale analysis of breast cancer characteristics from the BCAC, CIMBA, and ENIGMA consortia. *Breast Cancer Res*. 2014;16(6):3419. doi: 10.1186/s13058-014-0474-y.
10. Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, et al. Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21(1):134-47. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-11-0775. Epub 2011 Dec 5.
11. Forbes C, Fayter D, de Kock S, et al. A systematic review of international guidelines and recommendations for the genetic screening, diagnosis, genetic counseling, and treatment of BRCA-mutated breast cancer. *Cancer Manag Res*. 2019 Mar 22;11:2321-2337. doi: 10.2147/CMAR.S189627. eCollection 2019.
12. Kenan ES, Friger M, Shochat-Bigon D, et al. E. Accuracy of Risk Prediction Models for Breast Cancer and BRCA1/BRCA2 Mutation Carrier Probabilities in Israel. *Anticancer Res*. 2018;38(8):4557-4563. doi: 10.21873/anticancer.12760.
13. Grant RC, Holter S, Borgida A, et al. Comparison of Practice Guidelines, BRCAPRO, and Genetic Counselor Estimates to Identify Germline BRCA1 and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. *J Genet Couns*. 2018;27(4):988-995. doi: 10.1007/s10897-018-0212-1. Epub 2018 Feb 13.
14. Coopey SB, Acar A, Griffin M, et al. The impact of patient age on breast cancer risk prediction models. *Breast J*. 2018;24(4):592-598. doi: 10.1111/tbj.12976. Epub 2018 Jan 8.
15. Moghadasi S, Grundeken V, Janssen LAM, et al. Performance of BRCA1/2 mutation prediction models in male breast cancer patients. *Clin Genet*. 2018;93(1):52-59. doi: 10.1111/cge.13065. Epub 2017 Sep 25.
16. Plon SE, Eccles DM, Easton D, et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat*. 2008;29(11):1282-91. doi: 10.1002/humu.20880.
17. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17:405–424.

18. Cline MS, Liao RG, Parsons MT, et al. BRCA Challenge: BRCA Exchange as a global resource for variants in BRCA1 and BRCA2. *PLoS Genet.* 2018;14(12):e1007752. doi: 10.1371/journal.pgen.1007752. eCollection 2018 Dec.
19. Carbine NE, Lostumbo L, Wallace J, et al. Risk-reducing mastectomy for the prevention of primary breastcancer. *CochraneDatabaseof SystematicReviews* 2018, Issue 4. Art. No.: CD002748. DOI: 10.1002/14651858.CD002748.pub4.
20. Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL et al. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *New Engl J Med* 2002; 346: 1616-1622.
21. Kauff ND, Satagopan JM, Robson ME, et al. Risk-Reducing Salpingo-oophorectomy in Women with BRCA1 or BRCA2 Mutation. *Ne Engl J Med* 2002, 346:1609-1615.
22. Rebbeck TR, Kauff ND, Domchek SM. Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutations carriers. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101: 80-87.
23. Finch AP, Lubinski J, Moller P et al. Impact of oophorectomy on cancer incidence and mortality in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *J Clin Oncol* 2014; 32(15): 1547-53.
24. Finch A, Beiner M, Lubinski J et al. Salpingo-oophorectomy and the risk of ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer in women with BRCA1 or BRCA2 mutation. *JAMA* 2006; 296: 185-192.
25. Shu CA, Pike MC, Jotwani AR et al. Uterine Cancer After Risk-Reducing Salpingo-oophorectomy Without Hysterectomy in Women With BRCA Mutations. *JAMA Oncol.* 2016; 2(11): 1434-1440.
26. Cuzick J, Sestak I, Bonanni B, et al. Selective oestrogen receptor modulators in prevention of breast cancer: an updated meta-analysis of individual participant data. *Lancet.* 2013 May 25;381(9880):1827-34. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60140-3. Epub 2013 Apr 30. Review.
27. Fisher B, Constantino JP, Wickerham DL. et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project PI Study. *J Natl Cancer Inst.*1998;90:1371-1388.
28. Paul J Ross, Trevor J Powles. Results and Implications of the Royal Marsden and Other Tamoxifen Chemoprevention Trials. *Clin Breast Cancer.* 2001 Apr;2(1):33-6; discussion 37-40.
29. Veronesi U, Maisonneuve P, Rotmensz N, et al. Tamoxifen for the prevention of breast cancer: late results of the Italian Randomized Tamoxifen Prevention Trial among women with hysterectomy. *J Natl Cancer Inst.* 2007 May 2;99(9):727-37.
30. Cuzick J, Sestak I, Cawthorn S, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: extended long-term follow-up of the IBIS-I breast cancer prevention trial. *Lancet Oncol* 2015; 16: 67-75. (PMID: 25497694).
31. Xu L, Zhao Y, Chen Z et al. Tamoxifen and risk of contralateral breast cancer among women with inherited mutations in BRCA1 and BRCA2: a meta-analysis. *Breast Cancer.* 2015 Jul; 22(4): 327-34.
32. Cauley JA, Norton L, Lippman ME, et al. Continued breast cancer risk reduction in postmenopausal women treated with raloxifene: 4-year results from the MORE trial. Multiple outcomes of raloxifene evaluation. *Breast Cancer Res Treat.* 2001 Jan;65(2):125-34. Erratum in: *Breast Cancer Res Treat* 2001 May;67(2):191.
33. Martino S, Cauley JA, Barrett-Connor E, et al. Continuing outcomes relevant to Evista: breast cancer incidence in postmenopausal osteoporotic women in a randomized trial of raloxifene. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Dec 1;96(23):1751-61.
34. Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *JAMA.* 2006 Jun 21;295(23):2727-41. Epub 2006 Jun 5. Erratum in: *JAMA.* 2006 Dec 27;296(24):2926. Erratum in: *JAMA.* 2007 Sep 5;298(9):973.
35. Goss PE, Ingle JN, Alés-Martínez JE, et al. Exemestane for breast-cancer prevention in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 2011 Jun 23;364(25):2381-91. doi: 10.1056/NEJMoa1103507. Epub 2011 Jun 4.
36. Cuzick J, Sestak I, Forbes JF, et al. Anastrozole for prevention of breast cancer in high-risk postmenopausal women (IBIS-II): an international, double-blind, randomised placebo-controlled trial.

- Lancet. 2014 Mar 22;383(9922):1041-8. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62292-8. Epub 2013 Dec 12. Erratum in: Lancet. 2014 Mar 22;383(9922):1040. Lancet. 2017 Mar 11;389(10073):1010.
37. Veronesi U, Mariani L, Decensi A, et al. Fifteen-year results of a randomized phase III trial of fenretinide to prevent second breast cancer *Ann Oncol*. 2006 Jul;17(7):1065-71. Epub 2006 May 4.
  38. Iodice S, Barile M, Rotmensz N et al. Oral contraceptive use and breast or ovarian cancer risk in BRCA1/2 carriers: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2010 Aug; 46(12):2275-2284.
  39. Grandi G, Toss A, Cagnacci A. Combined Hormonal Contraceptive Use and Risk of Breast Cancer in a Population of Women With a Family History. *Clin Breast Cancer*. 2018 Feb; 18(1): e15-e24.
  40. Rennert G, Bisland-Naggan S, Barnett-Griness O et al. Clinical outcomes of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. *N Engl J Med* 2007;357:115-123.
  41. Bordeleau L, Panchal S, Goodwin P. Prognosis of BRCA-associated breast cancer: a summary of evidence. *Breast Cancer Res Treat* 2010;119:13-24.
  42. Torrisi R, Zuradelli M, Agostinetti E, et al. Platinum salts in the treatment of BRCA-associated breast cancer: A true targeted chemotherapy? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019 Mar;135:66-75. doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.01.016. Epub 2019 Jan 30. Review.
  43. Robson ME, Tung N, Conte P, et al. OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2019 Apr 1;30(4):558-566. doi: 10.1093/annonc/mdz012.
  44. Ledermann J, Harter P, Gourley C, et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomized phase 2 trial. *Lancet Oncol*.2014;15:852-61.
  45. Mirza MR, Monk BJ, Herrstedt J, et al.. Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 2016 Dec 1;375(22):2154-2164. Epub 2016 Oct 7
  46. Coleman RL, Oza AM, Lorusso D et al. Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2017 Oct 28;390(10106):1949-1961. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32440-6. Epub 2017 Sep 12. Erratum in: *Lancet*. 2017 Oct 28;390(10106):1948.
  47. Li H, Feng B, Miron A, et al. Breast cancer risk prediction using a polygenic risk score in the familial setting: a prospective study from the Breast Cancer Family Registry and kConFab. *Genet Med*. 2017;19(1):30-35. doi: 10.1038/gim.2016.43. Epub 2016 May 12
  48. Couch FJ, Shimelis H, Hu C, et al. Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2017;3(9):1190-1196. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0424.
  49. Tedaldi G, Tebaldi M, Zampiga V, et al. Multiple-gene panel analysis in a case series of 255 women with hereditary breast and ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017;8(29):47064-47075. doi: 10.18632/oncotarget.16791.
  50. Hoyer J, Vasileiou G, Uebe S, et al. Addition of triple negativity of breast cancer as an indicator for germline mutations in predisposing genes increases sensitivity of clinical selection criteria. *BMC Cancer*. 2018;18(1):926. doi: 10.1186/s12885-018-4821-8.
  51. Rana HQ, Sacca R, Drogan C, et al. Prevalence of germline variants in inflammatory breast cancer. *Cancer*. 2019 Apr 1. doi: 10.1002/cncr.32062. [Epub ahead of print]
  52. Hartley T, Cavallone L, Sabbaghian N, et al. Mutation analysis of PALB2 in BRCA1 and BRCA2-negative breast and/or ovarian cancer families from Eastern Ontario, Canada. *Hered Cancer Clin Pract*. 2014;12(1):19. doi: 10.1186/1897-4287-12-19. eCollection 2014.
  53. Antoniou AC, Foulkes WD, Tischkowitz M. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *N Engl J Med*. 2014;371(17):1651-2. doi: 10.1056/NEJMc1410673. No abstract available