

All. sub A)

TITOLO PIANO PER L'INNOVAZIONE DEL SISTEMA SANITARIO BASATO SULLE SCIENZE OMICHE

INDICE
PARTE PRIMA
1. Introduzione: perché questo Piano?
a. Il contesto programmatico
b. Vision, principi, struttura e obiettivi generali
2. Basi scientifiche e concettuali delle tecniche omiche

PARTE SECONDA
3. La genomica nella diagnosi
a. Malattie Mendeliane
b. Malattie Complesse e multifattoriali
c. Tumori
i. Mutazioni germinali
ii. Mutazioni somatiche
4. La prevenzione personalizzata
a. Test Pre-concezionali
b. Test Prenatali
1. NIPT
2. La diagnosi prenatale genomica (NGPD)
c. Screening Neonatale ed Approcci genomici
d. Test postnatali per:
1. Malattie Mendeliane
2. Malattie Complesse

i. Concetti generali
ii. Malattie cardiovascolari multifattoriali
3. Tumori
i. Mutazioni germinali per tumori ereditari
1. Tumore della mammella
2. Sindrome di Lynch
ii. Mutazioni germinali per suscettibilità a tumori
1. Cancro alla Prostata
iii. Mutazioni somatiche
5. La genomica nella terapia
a. Risposta ai farmaci e farmaco genomica
b. Terapia personalizzata dei tumori
6. Funzione di governo centrale e azioni di supporto alla implementazione del piano
7. Indicazioni per la ricerca e l'innovazione
8. Approfondimenti
a. Aspetti etici degli approcci genomici
b. Test genetici diretti al consumatore
c. L'omica batterica
d. Test post-natali per le malattie cardiache mendeliane
e. Valutazioni economiche
9. Obiettivi e Raccomandazioni
10. Glossario ed acronimi

PARTE PRIMA

CAPITOLO 1

Introduzione: perché questo Piano?

- *La finalità.* I progressi nell'ambito della genomica hanno implicazioni evidenti e cruciali per la salute pubblica; tali conoscenze permettono infatti di riconoscere più facilmente le basi genetiche delle malattie ereditarie ed offrono l'opportunità di differenziare, all'interno delle popolazioni, individui e gruppi maggiormente suscettibili di sviluppare determinate condizioni, e questo con modalità nuove rispetto a quelle tradizionalmente usate dai professionisti di sanità pubblica. Nonostante la genomica abbia visto uno sviluppo notevole nell'ultimo decennio, ed un progresso ancora più rapido sia atteso nel prossimo futuro, fino ad oggi il suo impatto sulle politiche sanitarie è stato limitato. Questo atto di pianificazione nasce quindi dalla esigenza di integrare la sempre maggiore disponibilità di strumenti sofisticati nel settore delle scienze genomiche con le pratiche correnti di sanità pubblica. Nello specifico, la finalità del piano è delineare le modalità con cui l'innovazione nel settore della genomica si debba innestare nel SSN negli ambiti della prevenzione, diagnosi e cura, in un'ottica di efficacia (*evidence-based*) e di sostenibilità (*cost-effectiveness*) del SSN ai fini del miglioramento della salute dell'individuo e della popolazione.

Il Piano si inserisce in una strutturazione di *'governance'* e *'capacità di sistema'* che da un lato si basa su e valorizza iniziative già in corso (es. progetti supportati dal Ministero della Salute ed altri Enti Finanziatori), e dall'altro necessita di una pianificazione adeguata a livello nazionale (interventi legislativi).

- *Lo scenario.* I sistemi sanitari di tutto il mondo stanno affrontando una fase cruciale e delicata, caratterizzata da un'elevata pressione finanziaria che rischia di minare la sostenibilità di tali sistemi. Per affrontare la sfida di questo scenario in evoluzione, i sistemi sanitari dovranno gestire tre nodi cruciali: ridare centralità al cittadino nel contesto del sistema; dare maggiore enfasi alle attività di prevenzione; riorganizzare radicalmente il servizio spostando le cure dall'ospedale al territorio. Tuttavia, nei report più recenti né la genomica né le scienze della vita sono state considerate e discusse come settori importanti per lo scioglimento di questi nodi. Si suggerisce quindi, in linea con recenti report di esperti, che questi punti critici vengano affrontati anche con l'ausilio delle conoscenze e dei principi della genomica, in virtù di una consapevolezza che negli ultimi anni sta maturando sempre di più su queste tematiche tra i professionisti di sanità pubblica. Nello specifico, la genomica ed altre innovazioni scientifiche possono inserirsi in un trend sociale già in atto, cioè la sempre maggiore centralità dell'individuo, per rendere la salute pubblica e l'assistenza sanitaria più efficaci ed efficienti. La presente proposta quindi si focalizza su un nuovo paradigma che guarda oltre la genomica di sanità pubblica, e che sia indirizzato ai mutevoli bisogni sanitari delle popolazioni. Questo nuovo paradigma dovrebbe fondarsi sui seguenti pilastri: la personalizzazione dell'assistenza sanitaria; l'adozione di nuove tecnologie, accanto a quelle genomiche, al fine di incrementare la conoscenza degli individui, del loro stato di salute e di malattia - includendo in particolare nuove tecnologie biomediche e digitali come l'*imaging* ed i sensori *wireless* -; lo sviluppo e l'integrazione di

una prevenzione personalizzata, come approccio complementare alle classiche pratiche esistenti in sanità pubblica; l'uso della connettività mobile e delle crescenti capacità computazionali al fine di generare grandi quantità di dati (*big data*) da utilizzare per il progresso della sanità e di altri settori. Questo nuovo approccio supera esplicitamente quello della genomica classica, e unisce quelli che possono apparire campi totalmente distanti tra loro al fine di fornire un approccio più olistico all'assistenza sanitaria.

- *La sfida.* Sarà essenziale affrontare alcune sfide, man mano che i progressi nel campo della genomica aprono nuove opportunità per il miglioramento della salute attraverso l'uso di applicazioni genomiche e strumenti per la valutazione della storia di salute delle famiglie. È infatti sempre più difficile per i comitati di esperti valutare in tempo reale e meticolosamente i benefici ed i possibili danni derivanti delle applicazioni genomiche e degli strumenti di valutazione del rischio, visto il loro rapido aumento. Sono quindi necessari dati nazionali validi ed affidabili per stabilire le misure di riferimento e per monitorare i progressi. Le classiche fonti di dati amministrativi dei sistemi sanitari probabilmente non sono ancora adeguate a questo scopo. Lo sviluppo di un programma sulla stregua di *Healthy People* potrebbe pertanto essere ostacolato dalla limitata disponibilità sia di raccomandazioni basate sull'evidenza sia di dati nazionali per monitorare i progressi.
- *Lo sviluppo della genomica* (e delle scienze 'omiche' in generale) non comporta solo conseguenze sul piano della salute e della medicina. Per sua stessa natura la genomica contribuisce alla (e si alimenta della) innovazione della IT, tanto che è considerata componente e "funzione" dei Big Data. Questo comporta delle conseguenze almeno nelle seguenti tre dimensioni, che quindi entrano per tale motivo in questo Piano come garanzia di governabilità per il sistema Paese dell'innovazione basata sulle scienze omiche:
 - Norme e regole: l'innovatività degli scenari generati dalla ricerca omica, il carattere dei problemi posti, le esigenze nuove che scaturiscono dall'impetuoso sviluppo in questo campo, impongono un adeguamento del quadro di riferimento normativo. Ciò è evidente per la valutazione della conoscenza fruibile (con un ruolo per *l'Health Technology Assessment*) oppure per il governo della vendita *direct to consumer*, oppure per il *data sharing* (per rendere fattibile e governare tale cruciale fenomeno sia in Italia che nel contesto internazionale).
 - Logistica: le esigenze poste dalla "interrogazione dei Big Data" definiscono la necessità di costruire una capacità di sistema che riesca a integrare le capacità super-computazionali disponibili in Italia ma anche a farle interagire con risorse di questo tipo in altri Paesi. Il *networking* in questo campo assume quindi la caratteristica di una soluzione logistica automa ma non autarchica che, a sua volta, è *conditio sine qua non* per produrre nuova conoscenza rispetto alle esigenze "di scala" peculiari delle scienze omiche.
 - Innovazione: da un lato questo Piano intende acquisire all'interno del SSN le innovazioni culturali, scientifiche, tecnologiche ed erogative già in qualche modo acquisite dalla ricerca nelle scienze omiche. Intende anche promuovere le necessarie innovazioni congeniali alle caratteristiche di questo campo (per esempio tecnologie per rendere fruibili ai 'medici di prossimità' il corpus delle evidenze scientifiche effettivamente utilizzabili nel rapporto col

singolo paziente). Ma bisogna anche riconoscere una fondamentale questione che riguarda la necessità di assicurare al nostro Paese una dimensione di “innovazione continua”; in questo senso si deve riconoscere il legame specifico che lo sviluppo delle scienze omiche ha con la crescita economica. Pertanto, si tratta di attivare una capacità sistemica di “Ricerca e sviluppo” che garantisca tale prospettiva di crescita mediante un uso sistematico di concorsi di idee e bandi di start-up.

Considerazioni riguardo l'implementazione

- L'applicazione della genomica nell'assistenza sanitaria ha il potenziale di ridurre l'impatto delle malattie sulla salute della popolazione. Il successo sarà tanto maggiore quanto questa applicazione avverrà come naturale ampliamento e complemento dei tradizionali approcci di sanità pubblica.
- I professionisti che lavorano nel campo della salute pubblica e coloro che hanno ruoli di responsabilità nell'organizzazione del sistema sanitario hanno il compito di iniziare e facilitare il processo di implementazione al fine di assicurare un giusto equilibrio e di favorire la consapevolezza nei decisori politici.
- Per una corretta implementazione della medicina genomica è di importanza centrale l'educazione di professionisti, cittadini, decisori politici ed altri portatori di interesse.

1.a Il contesto programmatico

I contenuti del presente Piano tengono conto in primo luogo e in senso generale degli assetti specifici del SSN ed in secondo luogo dei seguenti atti di pianificazione strategica internazionale e nazionale:

✓ ***WHO Global action plan for the prevention and control of non-communicable diseases 2013-2020.***

L'Italia ha sottoscritto l'obiettivo di ridurre, per il 2010, del 25% il rischio di mortalità prematura per malattie cardiovascolari, cancro, diabete e malattie respiratorie croniche. Come è evidente, questo obiettivo solleva potenzialmente il nostro sistema paese da un carico prevenibile di eventi morbosi e mortali, rafforzando il contributo da parte del servizio sanitario al sistema di *welfare* e rendendo questo più sostenibile, anche in relazione agli andamenti demografici tipici del nostro Paese. Questa caratteristica è, in modo particolare, attribuibile all'obiettivo sulla riduzione della mortalità prematura da malattie croniche non trasmissibili, pur essendo valorizzabili in tal senso anche gli obiettivi sulla riduzione degli effetti dell'inquinamento, delle alterazioni epigenetiche e delle malattie infettive.

✓ ***WHO The Human Genetic Programme.***

La WHO ha definito una propria *policy* di indirizzo in questo campo. Essa è basata sulla necessità di utilizzare le potenzialità della genomica (e delle biotecnologie correlate) identificando interventi innovativi per raggiungere gli obiettivi di salute e mezzi costo-efficaci per la prevenzione, diagnosi e

cura delle malattie. Nello stesso tempo, è identificato come fondamentale considerare le implicazioni etiche, legali e sociali nonché potenziare la ricerca.

✓ ***European Union Council conclusions on personalized medicine for patients.***

Riguarda la medicina personalizzata come “modello che utilizza la caratterizzazione del fenotipo e del genotipo degli individui per personalizzare la strategia terapeutica per la persona giusta al momento giusto, e/o per determinare la predisposizione alla malattia e/o per erogare tempestivamente interventi di prevenzione mirati”.

Invita gli Stati membri a sviluppare politiche centrate sul paziente e basate sull'uso delle informazioni genomiche, integrandole nei programmi di sanità pubblica e di ricerca e, nel contempo, assicurando l'adeguata valutazione delle nuove conoscenze e la sostenibilità del sistema sanitario nazionale. Le conclusioni, tra l'altro (v.), forniscono indicazioni sull'equità di accesso ai servizi, sull'approccio multidisciplinare, sul coinvolgimento degli *stakeholders*, sulla comunicazione, sulla formazione dei professionisti, sull'importanza dell'acquisizione di nuove conoscenze (biobanche ecc.) per lo sviluppo di nuove tecnologie.

✓ **Intesa Stato Regioni e PPAA del 13/3/13 recante “Linee di indirizzo sulla genomica in sanità pubblica”.**

L'Intesa ha lo scopo di fornire, in modo sistematico e organico, indirizzi generali che consentano il governo di questa tematica - fortemente innovativa e strategica per il futuro del SSN - nell'ambito della sanità pubblica. A tale scopo vengono identificate le azioni finalizzate a definire una 'capacità di sistema' adeguata all'entità delle sfide che i progressi nelle scienze genomiche offrono e pongono al sistema sanitario.

✓ **Intesa Stato Regioni e PPAA del 30/10/14 recante “Documento Tecnico di indirizzo per ridurre il carico di malattia del cancro”**

L'intesa, nel quadro delle azioni necessarie alla lotta contro il cancro, sottolinea l'importanza di sviluppare pienamente le potenzialità della genomica e della proteomica come definizione della suscettibilità individuale; ribadisce inoltre che, in relazione alla grande crescita di conoscenze genetiche nella ricerca di base e nell'applicazione agli individui, è emergente la necessità di governare lo sviluppo di tale ricerca, la valutazione della sua applicabilità nell'ambito del sistema sanitario, in particolare della prevenzione, e la costruzione di una rete per promuovere gli obiettivi della genomica a livello di popolazione.

✓ **Piano Nazionale della Prevenzione 2014-18 (di cui all'intesa Stato regioni e PPAA del 13/11/14).**

Il PNP, nell'ambito della lotta alle malattie croniche non trasmissibili, identifica uno specifico obiettivo riguardante la prevenzione secondaria del tumore della mammella dovuto a rischio genetico (Definizione di percorsi diagnostico-terapeutici integrati con i programmi di screening).

✓ **DM 13/2/16 Documento di indirizzo per l'attuazione delle linee di supporto centrali al Piano Nazionale della Prevenzione 2014-2018.**

Il DM definisce due linee strategiche:

- una pianificazione finalizzata all'innovazione dell'erogazione dei servizi: si tratta di promuovere sistematicamente l'adeguamento dell'erogazione dei servizi con le acquisizioni della genomica soprattutto rispetto agli obiettivi già identificati dal PNP 2014-18 come maggiormente sfidanti per il sistema paese (innanzitutto, le malattie croniche non trasmissibili-macro-obiettivo 1). Tale linea strategica è sostanzialmente imperniata sul Consiglio Superiore della Sanità e in particolare sull'obiettivo assegnato al "Tavolo per la genomica" di proporre uno specifico atto di pianificazione;
- la promozione di una capacità di sistema, secondo le seguenti priorità: promuovere una autonoma ma non autarchica capacità di analisi dei Big data; rendere normativamente agevole il *data-sharing*, comprensivamente della normazione per la *privacy*, regolamentare l'acquisto on-line dei test genetici (in collaborazione con gli altri Paesi europei); definire un assetto di sistema delle valutazioni HTA applicate a questo campo; promuovere la *literacy* e la *capacity building* del mondo professionale e degli utilizzatori finali.

In definitiva, oltre allo scopo di valorizzare le acquisizioni della genomica innanzitutto a sostegno degli e in coerenza con gli obiettivi del PNP, si definisce quello di promuovere un complessivo innalzamento delle capacità di sistema di promuovere, governare e gestire il previsto impetuoso sviluppo delle conoscenze genomiche.

- ✓ **"Linee guida per le attività di Genetica Medica"** approvate dalla Conferenza Permanente per i Rapporti fra Stato e Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano (**G.U. n. 224 del 23.09.2004**), che forniscono le indicazioni per la corretta organizzazione e sviluppo delle attività di genetica medica. Successivamente, con proprio Decreto il Ministero della Salute (D.M. 8 Maggio 2007) ha costituito un'apposita Commissione Nazionale con il compito di dare attuazione alle suddette linee guida definendo i servizi di Genetica Medica e il loro ruolo nell'ambito del Servizio Sanitario Regionale, fissare i criteri per la certificazione e l'accreditamento istituzionale delle strutture di Genetica Medica, pianificarne le attività per l'utilizzo ottimale delle risorse del SSN e SSR da destinarvi, fornire indicazioni sul corretto utilizzo dei test genetici, determinare le forme di collegamento con la rete delle malattie rare, definire indicatori di valutazione economica, fissare regole sulla pubblicizzazione e sulla promozione dei test genetici e sulla consulenza genetica, procedere alla divulgazione di raccomandazioni basate sull'evidenza scientifica in tema di Genetica medica. Nel successivo Accordo sull' **"Attuazione delle linee guida per le attività di genetica medica" n. 241 del 26-11-2009**, si sottolinea come i test genetici costituiscano un importante strumento diagnostico che prevede una valutazione clinica preliminare delle indicazioni ed una successiva interpretazione con il coinvolgimento non solo dell'individuo ma anche dei familiari, e si invitano le Regioni ad impegnarsi a promuovere ed adottare percorsi diagnostico-assistenziali aderenti alle linee guida nazionali.

1.b Vision, principi, struttura e obiettivi generali

Vision

Il presente Piano postula, all'interno dell'assetto istituzionale attuale e relativamente alle materie trattate, un SSN che vuole:

- essere pienamente consapevole della profonda, copernicana innovatività delle scienze 'omiche' per gli effetti possibili sulla salute degli individui e delle popolazioni, sull'innovazione tecnologica, sulla spinta propulsiva allo sviluppo dell'intero sistema Paese;
- esprimere una strategia di 'governo dell'innovazione' della genomica ma anche inserirla nell'attuale contesto pianificatorio / programmatico;
- cogliere con prudenza e saggezza le opportunità attualmente già offerte dalla genomica come contributo alle sfide già in atto e al raggiungimento degli obiettivi di salute già definiti.

Principi

- Il Piano recepisce gli obiettivi sottoscritti a livello internazionale e incorpora gli obiettivi già decisi all'interno di Piani nazionali di settore. Nel fare ciò intende promuovere l'armonizzazione degli obiettivi formalizzati in tali atti garantendo un approccio complessivo di sanità pubblica.
- Il Piano fissa obiettivi supportati da strategie ed azioni *evidence based*, in grado nel medio-lungo termine di produrre un impatto sia di salute sia di sistema e quindi di essere realizzati attraverso interventi sostenibili e "ordinari".
- Il Piano nel definire i propri obiettivi riconosce che è in corso (e che esso stesso contribuirà a) un rapido evolversi delle conoscenze basate sulla genomica (e su scienze affini) e quindi incorpora elementi di sviluppo e prevede un processo continuo e per quanto possibile tempestivo di aggiornamento.
- Il Piano riconosce l'importanza fondamentale della genesi e fruizione della conoscenza e pertanto riconosce la genesi di informazioni e la loro valutazione come elementi infrastrutturali indispensabili per il raggiungimento degli obiettivi di salute.
- Le azioni previste come attuative degli obiettivi di questo Piano tengono in conto:
 - il carattere universalistico del nostro sistema sanitario e la garanzia dell'equità
 - le implicazioni etiche, legali e sociali
 - un approccio *Life-course*
 - l'*empowerment* degli individui e delle comunità
 - l'importanza della responsabilità nella produzione, condivisione e uso dei dati.

Struttura del piano

La struttura del piano è finalizzata a identificare obiettivi specifici per le strutture del sistema sanitario, in riferimento quindi alla attuale tripartizione dei macrolivelli di assistenza di cui al DPCM 29/11/2001 (assistenza sanitaria collettiva, assistenza distrettuale, assistenza ospedaliera).

In particolare, i contenuti saranno articolati tenendo conto dell'apporto della genomica rispetto a: prevenzione, diagnosi e terapia.

Nell'affrontare i contenuti, sarà applicata la seguente struttura logica (che diventa il 'quadro logico centrale' del presente Piano):

a) Genesi della conoscenza: quale è la conoscenza disponibile?

Questo primo 'aspetto' nella scrittura riguarda il fatto che la produzione e la sintesi della nuova conoscenza alla base del presente atto di pianificazione assume alcuni caratteri innovativi. Quindi, oltre al 'razionale' scientifico di merito sembra opportuno evidenziare le 'innovazioni' possibili e sostenibili nel SSN. Tra questi emerge, sia sul piano epistemologico che organizzativo, il problema di "Interrogare i Big Data".

b) Fruibilità della conoscenza: quali conoscenze sono utilizzabili e mediante quali strumenti?

Questo aspetto definisce innanzitutto il campo delle nuove conoscenze basate sulla genomica che hanno, secondo i criteri HTA, sufficiente forza di evidenza da potere essere implementati (nonché in generale di 'utilizzabilità' secondo i principi ELSI), e le relative modalità di erogazione degli stessi (v. anche dopo).

c) Definizione del processo sanitario: quale sequenza di atti tecnico-professionali è *evidence-based* per raggiungere l'obiettivo di salute?

Questo aspetto ambisce a identificare quali siano sul piano delle evidenze scientifiche le 'conseguenze' operative (finalizzate ad un radicale riorganizzazione dei servizi) per la gestione dei cittadini e dei pazienti (mediante produzione di linee-guida ecc).

d) Erogazione dei servizi: sulla base degli aspetti trattati nei paragrafi precedenti, quali strumenti sono necessari per innovare l'erogazione dei servizi?

Questo aspetto riguarda gli strumenti (protocolli, percorsi diagnostico-terapeutici, sistemi d accreditamento) che dovranno essere messi a disposizione delle Regioni per l'organizzazione innovativa dei propri sistemi sanitari.

e) Valutazione: quali sistemi sono utilizzabili/devono essere progettati per valutare l'innovazione pianificata?

Questo aspetto riguarda il disegno e l'implementazione di sistemi di valutazione di processo e di impatto (a carattere ricorsivo) e la definizione di indicatori.

Gli obiettivi generali del Piano

Questo Piano identifica i seguenti obiettivi generali:

- 1) Traferire le conoscenze genomiche nella pratica dei servizi sanitari, in un approccio che metta al centro l'individuo.
- 2) Aumentare l'efficacia degli interventi di prevenzione, diagnosi e cura delle malattie a più alto *burden* tenendo in conto le differenze individuali relativamente a patrimonio genetico, stili di vita e ambiente e fornendo ai professionisti le risorse necessarie alla personalizzazione degli interventi.

3) Promuovere l'innovazione culturale, scientifica e tecnologica del sistema sanitario.

Bibliografia

1. Healthy People U.S. Department for Health and Human Services Offices of Disease Prevention and Health promotion <https://www.healthypeople.gov/>
2. Global Action Plan for the Prevention and Control of NCDs 2013-2020. http://www.who.int/nmh/events/ncd_action_plan/en/
3. Boccia S. Why is personalized medicine relevant to public health? Eur J Public Health 2014;24:349–50
4. Healthcare, E.S.G.o.S., Acting Together: A roadmap for sustainable healthcare, in White Paper. 2014
5. Beyond Public Health Genomics A Framework for Future Personalised Healthcare
6. <http://www.healthypeople.gov/2020/topics-objectives/topic/genomics>
7. Floridi L The 4th Revolution Oxford University Press 2014
8. Council conclusions on personalized medicine for patients adopted by the Council at its 3434th meeting held on 7 December 2015; <http://data.consilium.europa.eu/doc/document/ST-15054-2015-INIT/en/pdf>

CAPITOLO 2

Basi scientifiche e concettuali delle tecniche omiche.

- *Origine del suffisso -oma.* Il suffisso “-oma/omica” assume significati diversi a seconda del campo di applicazione. In biologia cellulare e molecolare viene in genere utilizzato per caratterizzare e quantificare insiemi di molecole biologiche rappresentative della struttura, funzione e dinamica di uno o più organismi. Le prime utilizzazioni di questo suffisso risalgono all'800 quando vennero conati i termini “rizoma” (1832; modificazione del fusto di una pianta, di solito a decorso orizzontale, con funzioni di riserva) e “scleroma/rinoscleroma” (1870; una malattia batterica, cronica, granulomatosa), seguite, a distanza di diversi anni, dai termini “mitoma” (1913; la parte più densa del protoplasma di una cellula), “bioma” (1916; complesso delle comunità climax mantenuto dalle condizioni ambientali di una regione e distinto dalle altre comunità) e “genoma”, un sostantivo coniato da Hans Winkler nel 1920, correntemente utilizzato per indicare la totalità aploide del DNA contenuto nella cellula di un organismo.

I bioinformatici ed i biologi molecolari sono stati tra i primi ad utilizzare su larga scala il suffisso “-oma”, che oggi annovera oltre 1000 neologismi.

- *Dalla Citogenetica alla citogenomica.* L'analisi citogenetica ha rappresentato, dal punto di vista storico, il primo esempio traslazionale di analisi del genoma, sia pure a bassissima risoluzione. Infatti, le tecniche citogenetiche standard, ad una risoluzione media di 320 bande, consentono di identificare riarrangiamenti (patologie cromosomiche) di dimensioni di poco inferiori alle 10 megabasi (Mb), ovvero 10 milioni di basi, mentre le tecniche molecolari hanno livelli risolutivi significativamente più elevati, da svariate chilobasi (una kb = 1000 coppie di basi), alle singole basi.

Negli anni '80 la citogenetica ha sviluppato alcuni protocolli in grado di analizzare le piastre cromosomiche decondensate, allo stadio prometafasico o profasico, permettendo di ottenere risoluzioni crescenti del genoma e di standardizzare ideogrammi contenenti fino a 850 bande per assetto cromosomico aploide, riuscendo cioè a raddoppiare il livello di definizione, rispetto ai preparati metafasici standard (cosiddette tecniche ad alta risoluzione).

Una parte del significativo divario esistente tra l'analisi del cromosoma visibile al microscopio ottico ed il gene è stato colmato dalle tecniche di citogenetica molecolare. La prima applicazione di questo tipo sui vetrini dei preparati cromosomici, l'ibridazione in situ, permetteva di riconoscere sulle cellule o sui cromosomi specifiche sequenze di acidi nucleici. Questa tecnica si basava sulla ibridazione, sui cromosomi acrocentrici, dell'RNA ribosomiale marcato con isotopi radioattivi e forniva una nuova dimensione allo studio dei cromosomi, in quanto facilitava la visualizzazione, sui preparati, di sequenze complementari di DNA o di RNA. L'uso di molecole fluorescenti degli anni '80 ha consentito di sviluppare e standardizzare l'ibridazione in situ fluorescente (FISH), basata sul legame diretto (combinato con un fluorocromo) o indiretto (attraverso una molecola intermedia incorporata nella sonda) con le basi del DNA. In questo modo è stato possibile elevare significativamente la risoluzione dell'analisi ed identificare riarrangiamenti cromosomici submicroscopici, creando una vera e propria rivoluzione citogenetica (la seconda dopo l'introduzione delle tecniche di bandeggiamento). Negli anni sono state messe a punto varie tecniche di crescente sensibilità, basate sulla FISH, e sono stati sviluppati strumenti sempre più sofisticati per l'acquisizione digitale, il pre-processamento e l'analisi

digitale delle immagini. Queste tecniche hanno consentito di utilizzare simultaneamente una o più sonde di DNA.

L'ibridizzazione genomica comparativa (CGH) è una tecnica che, con un singolo esperimento, analizza sui cromosomi le variazioni del numero delle copie (CNV), in termini di guadagno/duplicazione o perdita/delezione. Sviluppata all'inizio degli anni '90, si basa su una FISH quantitativa a due colori, che analizza direttamente il DNA. Sebbene questa tecnica abbia segnato un sostanziale progresso nella risoluzione degli sbilanciamenti genomici, il guadagno di informazione risultava ancora relativamente limitato (<3Mb) rispetto a quella dei preparati cromosomici bandeggiati. In questo contesto ha rappresentato un significativo progresso, alla fine degli anni '90, lo sviluppo di strumenti di CGH basati sugli array (array-CGH), nei quali i cromosomi metafasici sono stati sostituiti da sequenze di DNA adese ad un vetrino di supporto. L'array-CGH ha perciò sostituito in larga misura l'analisi citogenetica nella pratica clinica. Il suo principio è sostanzialmente quello della CGH e si basa su un'ibridizzazione genomica comparativa che utilizza come substrato un array anziché le metafasi.

Con gli SNP-array, basati sui polimorfismi dei singoli nucleotidi, è stata ottenuta una risoluzione fino a 5-10 kb. In questi casi non è necessaria la co-ibridizzazione del DNA di riferimento e del campione in esame, in quanto quest'ultimo può essere ibridizzato direttamente sull'array. Oltre a fornire informazioni sulle variazioni nel numero delle copie (CNV), queste piattaforme consentono di identificare le regioni di omozigosi e perciò i geni potenzialmente correlati alle malattie recessive, le aneuploidie in mosaico e le disomie uniparentali. La capacità diagnostica di queste tecniche può essere ulteriormente ottimizzata dalla associazione, sulla stessa piattaforma, dell'array-CGH e dello SNP-array.

La risoluzione degli array viene definita dal numero, dalle dimensioni e dalla distribuzione dei frammenti di DNA sul vetrino e correla con il numero dei frammenti fissati. Il loro limite resta l'impossibilità di identificare i riarrangiamenti cromosomici bilanciati.

In conclusione, le analisi citogenetiche e le tecniche di citogenetica molecolare offrono la possibilità di indagare il genoma umano a diversi livelli di risoluzione, per finalità diagnostiche e di ricerca. Sebbene le tecniche di citogenetica standard e molecolare, basate sulla FISH, siano state progressivamente sostituite dagli array, l'analisi dei cromosomi bandeggiati resta ancora la tecnica maggiormente utilizzata a livello mondiale per l'analisi genomica.

In parallelo con il progressivo aumento del numero delle malattie genomiche e cromosomiche diagnosticate con le analisi citogenetiche e citogenomiche, è diventato sempre più difficile riconoscere, in base al solo fenotipo clinico, la specifica condizione presente in un paziente. Anche se l'array-CGH è diventato uno strumento consolidato di diagnosi e da tempo sono disponibili algoritmi in grado di definire il numero delle copie, la risoluzione delle piattaforme è in continuo sviluppo. I dati clinici e citogenetici raccolti nei database a libero accesso contribuiscono a conoscere le combinazioni delle varianti ad effetto patogenetico, ma al momento resta ancora spesso problematico differenziare le perdite e le acquisizioni di significato patogenetico. Per questo, nella pratica corrente, le CNV vengono ancora classificate come "benigne" o varianti genomiche normali, "patogenetiche" o di potenziale rilevanza clinica, e di "incerto" significato clinico (o VUS - *Variant of Unknown Significance*). Il numero delle tecnologie applicate allo studio del genoma umano è in continua trasformazione. L'uso

di piattaforme per il sequenziamento di seconda generazione si è progressivamente trasferito dalla ricerca nella pratica clinica. Si tratta di tecniche per molti aspetti alternative ai microarray, anche se, analogamente ad essi, al momento non risolvono tutti i problemi di tipo interpretativo.

- *Dal sequenziamento di un gene a quello dell'intero genoma.* Le prime metodologie di sequenziamento del DNA risalgono agli anni '70. Tra queste, la strategia sviluppata da Sanger, basata sul metodo enzimatico dei terminatori di catena e sulla migrazione elettroforetica dei prodotti della reazione di sequenziamento, è ancora oggi ampiamente utilizzata per il sequenziamento di singoli frammenti di DNA. Questo metodo, che consente di ottenere prodotti di sequenziamento lunghi fino a 800-1000 basi, è stato automatizzato per aumentarne la processività. Tuttavia, le limitazioni intrinseche alla metodologia (alto costo di esecuzione e bassa efficienza) non permettono la sua applicazione nel sequenziamento su larga scala.

Più recentemente, sono state sviluppate nuove metodologie, riunite sotto il nome di sequenziamento ad elevato parallelismo o sequenziamento di seconda generazione (cosiddetto Next Generation Sequencing - NGS), che hanno la capacità di sequenziare molti frammenti di DNA contemporaneamente, anche se con efficienza minore in termini di numero di basi sequenziate per frammento. Queste nuove tecnologie possono fornire, a prezzo contenuto, milioni di sequenze di DNA per singolo esperimento e, grazie alla loro alta processività, consentono di acquisire un'enorme quantità di informazioni sul patrimonio genetico individuale. Il loro uso rende possibile, ad esempio, il sequenziamento di un intero genoma in pochi giorni, un'analisi che richiederebbe anni per essere completata con le tecniche tradizionali di sequenziamento. Queste tecnologie, anche grazie allo sviluppo degli strumenti bioinformatici richiesti per la gestione e l'analisi dei dati di sequenziamento, consentono di raggiungere obiettivi impensabili fino a pochi anni fa, sia sul piano della ricerca, rendendo più facile l'individuazione di nuovi geni implicati nelle malattie rare e ultra-rare, sia sul piano clinico, favorendo lo sviluppo di test diagnostici più rapidi ed efficienti.

La maggior parte delle malattie geniche sono eterogenee, cioè possono essere causate dalle mutazioni di geni diversi. La loro diagnosi molecolare ha utilizzato in prevalenza, per alcuni lustri, il sequenziamento secondo un approccio gene per gene. Tuttavia, nelle malattie causate dalla mutazione di molti geni, potenzialmente diversi nei singoli pazienti, questo approccio è costoso e richiede molto tempo, addirittura mesi o anni. Le tecniche di sequenziamento di seconda generazione consentono di superare tali limiti e molti laboratori le utilizzano oggi correntemente per caratterizzare il difetto molecolare delle malattie rare. Queste tecniche consentono di arricchire specifiche regioni genomiche (geni-malattia), sequenziare massivamente e in parallelo ampi tratti di DNA delle regioni selezionate ed analizzare diversi pazienti contemporaneamente.

Utilizzando le tecniche NGS è possibile analizzare fino a 96 campioni contemporaneamente, ciascuno per il pannello dei geni-malattia responsabili della condizione sospettata a livello clinico, ed ottenere dati analizzabili in circa 10-15 giorni. Le NGS hanno perciò rivoluzionato i protocolli dei test genetici, in quanto consentono di ottenere diagnosi molecolari in tempi brevi, ad un costo ridotto, mantenendo elevata la qualità dei risultati. Inoltre, hanno portato notevoli vantaggi a livello clinico, sia nel caso delle malattie ad elevata eterogeneità, sia in quelle associate ad un fenotipo sfumato, in cui può risultare maggiormente problematico ipotizzare il gene causativo coinvolto. Infatti, l'analisi simultanea di tutti i geni potenzialmente associati alla malattia in esame, riduce i tempi necessari ad identificare il difetto molecolare, migliorando la presa in carico e la consulenza genetica.

L'elevata potenzialità delle tecniche NGS ne ha determinato l'uso routinario nella diagnostica molecolare, in particolare nello studio delle malattie che condividono segni clinici, come ad esempio le Rasopatie (malattie collegate alle mutazioni dei geni della cascata di RAS). E' stato dimostrato che, in questi pazienti, l'uso di un pannello NGS contenente i geni-malattia noti riduce di circa otto volte i tempi necessari ad identificare il difetto molecolare e di circa sei volte i costi dell'analisi, rispetto al tradizionale sequenziamento Sanger. Inoltre permette, nei casi dubbi, di identificare il difetto molecolare prima dell'inquadramento clinico.

L'applicazione delle tecniche NGS, oltre ad essere utile nello studio delle malattie ad elevata eterogeneità, è importante anche nella diagnosi molecolare delle patologie causate dalla mutazione di geni di grosse dimensioni e delle malattie spesso causate da mutazioni in mosaico, ad esempio la sclerosi tuberosa, una malattia rara caratterizzata dallo sviluppo di tumori benigni, in particolare sulla pelle, nel cervello e nei reni.

L'analisi basata sulle tecniche NGS ha prodotto una significativa accelerazione nello studio delle malattie genetiche e spesso è risolutiva nell'inquadramento dei pazienti. Tuttavia, considerato l'elevato numero di regioni genomiche analizzate nel singolo paziente, identifica varianti di incerto significato, che possono creare problemi interpretativi, con ricadute negative sulla gestione clinica del paziente e sulla strutturazione della consulenza genetica. E' perciò indispensabile che i pazienti analizzati mediante NGS siano correttamente informati attraverso una consulenza genetica pre-test delle potenzialità e dei limiti della tecnica e che i risultati del test siano spiegati e commentati attraverso una consulenza successiva all'analisi.

- *Analisi esomica.* Sebbene il sequenziamento dell'intero genoma sia la strategia d'eccellenza per lo studio della variabilità genetica interindividuale, esso presenta ancora alcune problematiche che ne limitano l'applicazione su larga scala, in particolare le capacità computazionali richieste per l'analisi e l'archiviazione dell'enorme massa di dati prodotta. Per queste ragioni, le tecniche di sequenziamento di seconda generazione vengono oggi spesso utilizzate per sequenziare l'esoma, cioè la porzione codificante del genoma. Con questo approccio, basato sull'arricchimento dei frammenti genomici che si riferiscono alle sequenze geniche codificanti per proteine e per sottoclassi selezionate di RNA che hanno una funzione regolatoria (cioè microRNA), è possibile esaminare solo una piccola porzione del genoma (1-2%). Questa analisi non prende in considerazione le regioni non codificanti del genoma, che peraltro possono avere un impatto sull'espressione genica. Tuttavia, in base alle attuali conoscenze sulle cause genetiche delle malattie mendeliane, è largamente accettato che la maggior parte delle mutazioni responsabili delle malattie mendeliane causi cambiamenti nella sequenza codificante di un gene o determini un processamento aberrante del trascritto. Per questo motivo, l'esoma rappresenta un sottoinsieme particolarmente arricchito del genoma nel quale è utile cercare eventuali mutazioni di potenziale impatto funzionale. In accordo con questa nozione, il sequenziamento mirato della porzione codificante del genoma si è dimostrato un approccio particolarmente efficiente per comprendere le basi molecolari delle malattie mendeliane, al punto che negli ultimi anni ha consentito di identificare oltre 500 geni-malattia.

Nonostante che i dati prodotti dal sequenziamento di un esoma siano maggiormente maneggevoli rispetto a quelli ottenuti dal sequenziamento dell'intero genoma, la fase di analisi e di interpretazione delle varianti rappresenta una sfida piuttosto complessa. Negli ultimi anni, sono stati sviluppati numerosi strumenti bioinformatici per il processamento, l'analisi e l'annotazione dell'informazione

contenuta in un esoma. In generale, le piattaforme di sequenziamento generano un'enorme quantità di dati grezzi, che vengono convertiti in sequenze nucleotidiche mediante strumenti computazionali. I *file* così generati di solito si trovano in un formato che contiene, oltre alla lettura delle sequenze nucleotidiche, *score* di qualità associati ad ogni base letta. La risoluzione a singola base di un esoma richiede l'analisi di questi *file* mediante l'uso di un complesso flusso di lavoro bioinformatico che permette, in una prima fase, di allineare le sequenze prodotte al genoma di riferimento e, successivamente, di identificare e annotare funzionalmente le varianti che lo caratterizzano. La fase di allineamento viene eseguita con sistemi computazionali che confrontano ciascuna delle sequenze prodotte con il genoma di riferimento, permettendone il loro corretto posizionamento. Per garantire l'affidabilità di questi sistemi ed ottenere una valutazione globale dell'efficienza di sequenziamento, si applicano di solito diversi parametri di qualità. Tra essi, particolarmente rilevanti sono la copertura (*coverage*), cioè la percentuale di sequenze genomiche bersaglio coperte dal sequenziamento, e la profondità (*depth*), ossia il numero di letture riferite ad una specifica base della sequenza genomica d'interesse. La fase successiva dell'approccio bioinformatico è la "chiamata delle varianti", che identifica i siti varianti in cui le sequenze allineate differiscono dalle sequenze note nella posizione di riferimento. Le varianti così ottenute, possono essere processate con metodi euristici di prioritizzazione e filtraggio, al fine di ridurre l'alto numero di varianti annotate e selezionare quelle con significato funzionale. Generalmente, nella prima fase di questo approccio vengono eliminate le varianti polimorfiche che si suppone non abbiano un impatto patologico su un fenotipo assunto come "raro". A tale scopo, si utilizzano di solito banche-dati pubbliche come dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) e ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>), che permettono di identificare le varianti di bassa frequenza nella popolazione o non annotate. In una seconda fase, si raccolgono e valutano le informazioni disponibili su ciascuna variante e sul relativo gene, in modo da ordinare, per priorità, le prime in base al loro effetto predetto, ed i geni in base alla loro rilevanza biologica (ad es. espressione, funzione), rispetto al fenotipo d'interesse. Per l'annotazione e la predizione funzionale delle varianti si utilizzano diversi strumenti, ognuno dei quali ha punti di forza e debolezza. Per questa ragione, in genere si consiglia di attuare una strategia di prioritizzazione in grado di sfruttare più strumenti di predizione. Ad esempio, in questo contesto, un metodo recente, dbNSFPv.2.0 (*database for Nonsynonymous SNPs' Functional Predictions*), facilita questo processo perché integra gli *score* di previsione e di conservazione derivati da alcuni dei più comuni algoritmi in uso. Data la sua potenzialità, questo strumento bioinformatico è facilmente applicabile al filtraggio ed alla prioritizzazione delle varianti ottenute per lo studio delle malattie mendeliane. Analogamente, sono stati sviluppati diversi strumenti per integrare l'informazione disponibile nelle banche-dati e facilitare approcci di prioritizzazione basati su criteri oggettivi.

Il sequenziamento dell'esoma si è dimostrato particolarmente efficiente in ambito diagnostico. Recenti studi concordano per una *detection rate* del 40% circa per le patologie senza nome o con diagnosi non accertata. Occorre tuttavia precisare che il successo nel raggiungere una diagnosi su base molecolare attraverso il sequenziamento dell'esoma può variare considerevolmente in base al tipo di patologia in esame ed alla strategia di sequenziamento utilizzata (analisi del solo probando *vs* analisi del nucleo familiare). L'uso del sequenziamento dell'esoma nella pratica clinica ha confermato le grandi potenzialità, ma anche la difficoltà di interpretazione dei dati ottenuti, particolarmente nel caso delle varianti in precedenza non annotate. Si deve anche considerare l'aspetto relativo all'identificazione delle variazioni di sequenza nei geni implicati in malattie non correlate con il quadro

clinico che ha motivato l'accertamento molecolare. Questo problema è particolarmente rilevante per il maggior potere risolutivo dell'analisi esomica e per l'attuale scarsa conoscenza sulla ricaduta fenotipica della maggior parte delle varianti genetiche.

Occorre infine sottolineare che i dati attualmente disponibili indicano che il tasso di errore del sequenziamento di seconda generazione è basso, ma non trascurabile, ed è strettamente dipendente dal tipo di variazione (singolo cambiamento nucleotidico *vs* inserzione/delezione di più basi) e dal suo contesto di sequenza. Di conseguenza, è sempre necessario validare la variante selezionata con il sequenziamento Sanger che rappresenta, ancora oggi, il metodo di sequenziamento di riferimento.

- *Sequenziamento dell'intero genoma.* Le tecniche di sequenziamento di seconda generazione hanno reso possibile l'analisi dell'intero genoma a costi e tempi stimati oggi oltre 100mila volte più bassi rispetto a quelli necessari nel 2000, quando è stata prodotta la prima mappa del genoma umano. In pratica si è passati dagli oltre 100 milioni di dollari e dai tempi allora necessari, che venivano misurati in anni, ad un migliaio di dollari e a pochi giorni per il completamento di questi studi. Di conseguenza, oggi sono diventati in proporzione significativamente più elevati i costi dell'analisi bioinformatica, necessaria ad interpretare i milioni di dati prodotti, rispetto a quelli della genotipizzazione.

Le *analisi genome wide* hanno avuto un grande impatto nella comprensione delle differenze e perciò della variabilità interindividuale e hanno dato un senso ad una celebre affermazione di Sir William Osler, risalente al 1892, che asseriva *“se non esistesse la variabilità tra le persone la medicina sarebbe una scienza e non un'arte”*, a sottolineare che *“esistono i malati, non le malattie”*. Per lungo tempo il senso di questa variabilità non è apparso chiaro, anche se, proprio in quel periodo, una scuola di pensiero, quella del determinismo, tendeva a ricondurla alle caratteristiche ereditate al momento del concepimento, in un momento in cui si era ancora ben lontani dal comprenderne le basi biologiche. Nel secolo scorso, di pari passo con la scoperta della struttura e della funzione del DNA, si è affermato il concetto che lo stato di salute e di malattia sono il risultato dell'interazione tra le caratteristiche genetiche e l'ambiente. E' diventato contestualmente chiaro che, mentre alcune malattie sono prioritariamente riconducibili ai fattori genetici (patologie cromosomiche, genomiche, mendeliane, mitocondriali) ed altre all'ambiente (traumi, ustioni, ecc.), altre ancora, in particolare molte malattie comuni (cardiovascolari, diabete, ipertensione, osteoporosi, ecc.) e diversi difetti congeniti (cardiopatie congenite, difetti del tubo neurale, labio-platoschisi, ecc.), originano dall'effetto additivo tra la suscettibilità geneticamente determinata e l'ambiente. La componente genetica di questo sistema complesso è definita “ereditabilità” (h^2) ed è perciò riconducibile alle caratteristiche del genoma, mentre la componente ambientale, intesa come alimentazione, farmaci, microbioma, stili di vita, è sintetizzabile nell' “esposoma”, letteralmente tutto ciò a cui siamo esposti e con cui veniamo a contatto nel corso della nostra esistenza.

La rivoluzione genetica è stata trainata dalla rivoluzione tecnologica, che ha permesso di indagare per la prima volta i meccanismi biologici della variabilità interindividuale, nonché dell'ereditabilità. E' stato così scoperto che le persone differiscono tra loro di circa 4 milioni di basi, che circa una base ogni 200 basi è diversa e che ogni persona possiede oltre 1500 variazioni che la rendono diversa rispetto alle mappe di riferimento. L'unicità dell'individuo è ulteriormente definita dalle variazioni funzionali dei geni (il trascrittoma) e dei loro prodotti (proteoma e metaboloma), che variano nel tempo a livello tissutale e cellulare. Questo aspetto è bene illustrato dallo studio dei gemelli identici che, pur condividendo lo stesso patrimonio genetico, negli anni tendono a divergere sempre più a livello del loro fenotipo

clinico, in particolare per l'effetto modulante dell'esposoma sul genoma, nonché delle mutazioni somatiche.

A partire dal 2005, sono stati eseguiti oltre 2000 studi *genome wide* che hanno reclutato individualmente migliaia o diverse decine di migliaia di pazienti affetti da oltre 250 malattie complesse ed un numero analogo di soggetti non affetti, con lo scopo di identificare eventuali variazioni (mutazioni comuni o polimorfismi) differenzialmente rappresentati nei due gruppi. Le differenze osservate tra gli affetti ed i controlli sono riuscite a definire geni e regioni genomiche potenzialmente associate alla malattia in esame, che concorrono perciò alla sua ereditabilità. Complessivamente sono state identificate oltre 12.000 variazioni. Tuttavia, il potere predittivo dei singoli polimorfismi è basso, con un rischio aggiuntivo medio di 1,1-1,5; inoltre al momento, fatte salve alcune eccezioni, questi studi hanno definito solo il 15% o meno dell'ereditabilità delle singole malattie; infine, l'impatto traslazionale di queste ricerche rimane molto limitato, anche perché la frequenza di molti polimorfismi varia in maniera spesso molto significativa nelle diverse popolazioni e gli studi effettuati in una determinata area geografica necessitano di essere verificati e validati sulle altre popolazioni, prima di essere utilizzati a livello clinico. Pur con queste cautele, che rendono problematico il trasferimento delle ricerche nella consulenza genetica, non va ignorato che questo limitato potere predittivo non è in certi casi inferiore a quello in base al quale oggi viene calcolato il rischio mediante test non-genetici, utilizzati nella clinica, come ad esempio quelli relativi ai livelli del colesterolo LDL o agli antigeni prostata-specifici.

Non vi è dubbio che le analisi genomiche stiano comunque contribuendo alla comprensione delle basi biologiche delle malattie e dei caratteri poligenici. Così, ad esempio, alcuni studi hanno riscoperto una serie di geni indiziati da tempo per essere implicati in queste condizioni, oppure che erano già noti per essere mutati in alcune malattie mendeliane correlate; inoltre hanno evidenziato l'importanza di certi geni che codificano per i siti di azione di alcuni farmaci, come la sulfonilurea (negli studi del diabete tipo 2), le statine (negli studi che indagano i meccanismi di controllo dei livelli lipidici), gli estrogeni (negli studi sulla densitometria dell'osso), suggerendo potenziali strategie per la terapia delle malattie comuni. Infine, alcuni studi hanno messo in correlazione certe malattie complesse con nuove vie metaboliche. Ad esempio, le variazioni geniche associate alla degenerazione maculare senile hanno dimostrato la criticità di alcune componenti del sistema del complemento, mentre gli studi sulle malattie infiammatorie croniche dell'intestino, in particolare la malattia di Crohn, hanno evidenziato l'importanza dell'autofagia e dell'interleukina-23, e quelli sulla statura il ruolo dei geni che codificano proteine della cromatina e della via di *hedgehog* (una famiglia di geni che codificano segnali induttivi durante l'embriogenesi), in particolare una proteina secreta che stabilisce il destino delle cellule durante lo sviluppo.

L'eventuale uso clinico di queste analisi dovrebbe tuttavia tenere conto di una serie di cautele:

1. le persone non dovrebbero sottoporsi a questi test senza conoscere a priori come utilizzare i risultati;
2. almeno un test ogni 20, tra quelli con una dichiarata specificità del 95%, fornisce un risultato falso positivo e quindi il sequenziamento completo del genoma di una persona produce un risultato che contiene non meno di 6000 errori;

3. all'interno dei dati ottenuti, alcuni non hanno un chiaro significato clinico (i cosiddetti VUS – *Variations of Unknown Significance*), il che limita ulteriormente il potere predittivo di queste analisi;
4. il valore clinico di queste indagini dipende dalla possibilità di collegare specifiche varianti ad un miglioramento dell'esito clinico

Sebbene le indagini sulla suscettibilità appaiano al momento premature per quasi tutte le malattie complesse, questo scenario potrebbe cambiare nei prossimi anni. Ad oggi, comunque, le analisi sull'ereditabilità dei caratteri complessi restano essenzialmente oggetto di studio e di ricerca.

Quanto sopra raccomanda interventi di formazione e di informazione sulle potenzialità ed i limiti della cosiddetta medicina predittiva rivolta alle malattie complesse, basata sulle analisi genomiche, nonché di contrasto alla pubblicità ingannevole, al fine di limitare l'uso dei *test rivolti direttamente ai consumatori* che una commercializzazione spesso spregiudicata reclamizza con il miraggio di acquisire informazioni utili a cambiare il destino delle persone. Uno studio, che ha intervistato un campione rappresentativo di persone che si sono sottoposte alle analisi *genome wide* con finalità predittive, ha indicato che, dopo il test, il 34% ha cambiato la dieta, il 14% ha aumentato l'attività fisica, il 43% si è informato sulla patologia per la quale era stato ipotizzato un aumento della suscettibilità, il 28% ha condiviso i risultati con il medico di famiglia, il 9% ha effettuato ulteriori approfondimenti di laboratorio. Un risultato che complessivamente non giustifica i costi di un test così sofisticato!

Al momento stenta a decollare la promessa di Francis Collins formulata in occasione della conferenza di presentazione della prima bozza della mappa del genoma umano, il 26 giugno 2000: *“La medicina personalizzata sarà disponibile dall'anno 2010: avremo test in grado di identificare il rischio individuale di sviluppare malattie comuni e subito dopo disporremo di protocolli individualizzati di prevenzione e terapia”*. Tuttavia il divario, tra quanto anticipato e lo stato dell'arte, può costituire il volano per aiutare la ricerca a completare il processo di integrazione delle analisi -omiche nella pratica clinica.

Bibliografia

1. Monia Baker. Nature 2013; 494:416-419
2. ISCN 2013: An International System for Human Chromosome Nomenclature, Karger, Basel
3. Lepri et al. BMC Med Genet. 2014; 23:15:14
4. Kaufman et al. J Genet Couns, 2012; 21:413-22

PARTE SECONDA

CAPITOLO 3

La genomica nella diagnosi.

3.a Malattie mendeliane: impatto clinico del sequenziamento di seconda generazione

Dal sequenziamento Sanger al sequenziamento di seconda generazione.

Fino alla recente introduzione nella pratica clinica del sequenziamento di seconda generazione, l'analisi molecolare utilizzata per confermare la diagnosi clinica di una malattia potenzialmente genica, era il sequenziamento del gene o di un gruppo di geni d'interesse, utilizzando la tecnica sviluppata da Sanger. Questa metodologia, basata sull'analisi di frammenti di DNA della lunghezza di 200-500 basi, ottenuti per amplificazione *in vitro* con la reazione a catena della polimerasi (PCR), costituisce ancora oggi la strategia analitica elettiva per le malattie caratterizzate da bassa eterogeneità genetica, cioè causate da mutazioni in un ristretto numero di geni, o dovute alla mutazione di geni di piccole dimensioni. Nonostante le recenti implementazioni che ne hanno aumentato la processività, un limite principale di questa tecnologia risiede nella necessità di analizzare singolarmente i frammenti genomici d'interesse. Ciò diventa particolarmente problematico per le malattie causate dalle mutazioni di geni di grosse dimensioni e/o contenenti numerosi esoni, oppure per le malattie geneticamente eterogenee, cioè causate dalle mutazioni di geni diversi. Inoltre, l'elevato costo di esecuzione non consente di applicare questa tecnologia al sequenziamento su larga scala. Questi limiti sono stati oggi superati dall'uso, sempre più esteso, anche in ambito clinico, delle tecnologie di sequenziamento di seconda generazione. Grazie al loro basso costo, queste tecnologie consentono di analizzare un elevato numero di frammenti di DNA in parallelo e di sequenziare contemporaneamente molti geni, l'intera porzione del genoma che codifica per proteine (esoma), o addirittura l'intero genoma di una persona in pochi giorni. Queste tecniche permettono anche, in linea di principio, di identificare le varianti strutturali, ad esempio, le duplicazioni e le delezioni delle regioni genomiche. Per queste caratteristiche, il sequenziamento di seconda generazione e i diversi approcci diagnostici basati su questa tecnologia, rappresentano uno strumento diagnostico innovativo, di elevato interesse clinico, in quanto consentendo di effettuare indagini in precedenza tecnicamente impraticabili oppure economicamente onerose, nonché di abbattere sensibilmente i tempi e i costi della diagnosi molecolare.

Attualmente l'applicazione del sequenziamento di seconda generazione in ambito clinico si basa su tre principali strategie diagnostiche: il sequenziamento mirato di pannelli di geni-malattia (*targeted resequencing*), il sequenziamento dell'esoma e il sequenziamento dell'insieme dei geni noti per essere implicati nelle malattie. Una quarta strategia consiste nel sequenziamento dell'intero genoma, che consente, tra l'altro, una più estesa e omogenea copertura rispetto all'esoma. Tuttavia le criticità relative all'analisi, compresa l'interpretazione di tutte le variazioni identificate, l'archiviazione della massa dei dati prodotti ed i costi ancora troppo elevati, ne limitano il suo impiego in campo clinico-diagnostico. L'uso appropriato di queste strategie di sequenziamento e l'ulteriore evoluzione tecnologica, consentirà di ridurre i costi e i tempi della diagnosi e di ottenere la conferma molecolare di un'ipotesi diagnostica formulata attraverso una valutazione puramente clinica.

- *Targeted resequencing.* Il sequenziamento selettivo di un pannello di geni-malattia scelti sulla base della loro associazione con la malattia in esame costituisce la strategia d'eccellenza per la diagnosi molecolare delle malattie causate dalle mutazioni in geni di grandi dimensioni o di malattie geneticamente eterogenee. In quest'ultimo caso, l'analisi è indicata quando le mutazioni nei geni-malattia inseriti nel pannello spiegano una percentuale significativa dei casi o quando si sospetti la presenza di un mosaicismo. Considerato l'elevato beneficio in termini di costi, sensibilità e velocità dell'analisi, questa strategia di sequenziamento è già ampiamente utilizzata nella pratica clinica, ed è destinata a diventare l'approccio di prima scelta nell'analisi delle malattie geneticamente eterogenee (ad esempio le cardiomiopatie, le distrofie muscolari, le malattie metaboliche, la retinite pigmentosa, ecc.); delle malattie dovute a mutazioni di famiglie di geni (condizioni nosologicamente distinte che condividono una serie di segni clinici, ad esempio le RASopatie, le ciliopatie, ecc.); dello screening di geni di grandi dimensioni (e.g., *DMD*, *ATM*, *FBN1*, *MLL2*, *NF1*, ecc.).

Il sequenziamento di pannelli di geni consente anche di analizzare contemporaneamente decine di campioni. Questa maggiore efficienza è essenzialmente legata alla elevata profondità di lettura dei geni sequenziati, nettamente superiore a quella mediamente ottenuta con il sequenziamento dell'esoma. Tuttavia questo test non rileva le varianti strutturali e, ovviamente, non può rilevare varianti che interessano le regioni non codificanti dei geni esaminati. Lo svantaggio del sequenziamento mirato di pannelli di geni-malattia è legato essenzialmente alla necessità di un loro continuo aggiornamento, man mano che nuovi geni vengono associati alla malattia d'interesse e alla necessità, nel caso di esito negativo dello screening, di analizzare i pazienti attraverso sequenziamento dell'esoma.

- *Sequenziamento dell'esoma.* Il sequenziamento dell'esoma rappresenta, in linea di principio, la migliore strategia per arrivare alla diagnosi molecolare nel caso di una condizione per la quale i dati disponibili suggeriscono una base genetica non associata ad anomalie strutturali del genoma (ipotesi verificabile attraverso l'uso di approcci complementari quali l'ibridazione genomica comparativa e la genotipizzazione ad alta risoluzione), e quando il quadro clinico non è riconducibile ad una malattia nota, oppure sono stati in precedenza esclusi i geni associati ad una malattia nota. L'analisi dell'esoma può essere utilizzata anche come valida alternativa al *targeted resequencing* nel caso in cui la malattia presenti elevata eterogeneità genetica.

Numerosi studi finalizzati a stimare l'efficienza diagnostica dell'analisi dell'esoma convergono nell'indicare un tasso di successo superiore al 25% per le condizioni prive di un inquadramento diagnostico. Tale percentuale varia tuttavia in rapporto al tipo di malattia, alla selezione clinica, alla strategia di sequenziamento utilizzata. In particolare, il sequenziamento del nucleo familiare, anche se maggiormente costoso, è di solito più informativo. Tuttavia, il sequenziamento dell'esoma non è sempre in grado di rilevare le varianti strutturali e, come anticipato, neppure le varianti presenti nelle regioni non codificanti del genoma (il 98-99% del genoma non viene analizzato).

L'uso del sequenziamento dell'esoma nella pratica clinica ha confermato le grandi potenzialità, ma anche la difficoltà di interpretazione dei dati ottenuti, particolarmente nel caso di varianti in precedenza non annotate. La variabilità genetica inter- e intra-popolazione può rendere maggiormente difficile l'analisi di filtraggio e prioritizzazione delle varianti identificate e rende necessaria la creazione di banche-dati popolazione-specifiche per una più precisa valutazione della ricorrenza delle varianti rare. Nonostante il sostanziale miglioramento delle metodologie di cattura e/o arricchimento delle regioni

genomiche codificanti, e la sempre più dettagliata caratterizzazione della topologia funzionale del genoma, ancora oggi non sono disponibili kit in grado di coprire omogeneamente il 100% dell'esoma, incluse le regioni particolarmente ricche in GC, come il primo esone codificante di numerosi geni.

- *Esoma clinico.* Il cosiddetto 'esoma clinico' si pone tra l'analisi di pannelli di geni-malattia e l'analisi dell'intero esoma. Si basa sul sequenziamento dell'intera porzione codificante di tutti i geni noti per la loro rilevanza clinica, cioè in precedenza associati alle malattie. Questa strategia, a differenza del sequenziamento dell'esoma, per definizione non consente di identificare nuovi geni-malattia, ma è utile nel caso in cui la malattia presenti un'elevata eterogeneità genetica e i singoli geni-malattia siano mutati solo in una bassa percentuale dei casi; oppure, nel caso di malattie che, per la loro rarità, non sono state sufficientemente caratterizzate dal punto di vista clinico. Analogamente all'analisi dell'esoma, l'esoma clinico permette in linea di principio di identificare la coesistenza in un paziente di mutazioni responsabili di malattie genetiche distinte. Questa situazione non deve essere sottovalutata, in quanto questo tipo di associazione è stato documentato nel 5% dei casi in coorti non selezionate di pazienti analizzati utilizzando il sequenziamento dell'esoma per finalità diagnostiche.

La mole di dati acquisita con il sequenziamento dell'esoma può eventualmente essere analizzata considerando esclusivamente sottogruppi di geni di interesse. Questo approccio, noto come *targeted data analysis*, consente di focalizzare l'analisi sui dati genomici riguardanti pannelli selezionati "in silico" di geni-malattia precedentemente implicati nella patologia in esame. Questo approccio rende il sequenziamento dell'esoma particolarmente vantaggioso, in quanto consente di acquisire il più elevato livello di informazione in un singolo esame di laboratorio, e permette di analizzare successivamente i dati prodotti, tenendo conto delle conoscenze acquisite negli anni, o di formulare una diversa ipotesi diagnostica dopo la rivalutazione clinica del paziente.

Impatto clinico delle tecnologie di sequenziamento di seconda generazione

Le tecnologie di sequenziamento di seconda generazione trovano applicazione in diversi ambiti della medicina. Accanto alla diagnosi di malattie mendeliane, il loro uso trova impiego crescente in campo oncologico, nella caratterizzazione molecolare dei tumori, nell'identificazione di potenziali bersagli molecolari di terapia o di varianti di predisposizione all'insorgenza di tumori. Un'altra importante applicazione riguarda lo screening prenatale non invasivo sul sangue materno (*Non Invasive Prenatal Testing – NIPT*). Nonostante le difficoltà interpretative dovute all'alta densità dei dati prodotti, le informazioni generate dall'applicazione delle tecnologie di sequenziamento di seconda generazione, in particolare dall'analisi dell'esoma, offrono importanti opportunità per diagnosi più rapide e corrette, con enormi ricadute a livello clinico, consentendo una più rapida ed efficace presa in carico del paziente affetto da malattia genetica.

Anche se il tasso di errore del sequenziamento di seconda generazione è basso, esso non è trascurabile ed è strettamente dipendente dal tipo di variazione (singolo cambiamento nucleotidico *vs* inserzione/delezione di più basi) e dal suo contesto di sequenza. Di conseguenza, è sempre necessario validare le varianti identificate con il sequenziamento Sanger, che rappresenta ancora oggi il metodo di sequenziamento di riferimento, e, con la stessa metodica, verificarne la co-segregazione con la malattia nel nucleo familiare.

Un aspetto non marginale riguarda la gestione dei cosiddetti “risultati inattesi” (*incidental findings*), cioè l'identificazione di varianti di potenziale significato patogenetico all'interno di geni-malattia, ma non correlati con il quadro clinico che ha determinato l'indicazione all'accertamento molecolare. Alcuni di questi risultati potrebbero essere clinicamente rilevanti, come ad esempio le varianti d'interesse farmacogenetico, di predisposizione alle neoplasie o relativi alle malattie per le quali sono disponibili approcci terapeutici o di prevenzione. Questo problema è particolarmente rilevante stante l'elevato potere risolutivo dell'analisi esomica, ma anche per l'attuale scarsa conoscenza del significato funzionale e della rilevanza clinica della maggior parte delle varianti genetiche. Le conseguenti implicazioni sanitarie ed etiche devono essere gestite nel corso della consulenza genetica.

Obiettivi e Raccomandazioni

Da quanto esposto emergono le seguenti priorità, rispetto alle quali sono identificabili i relativi interventi (Tabella 1):

- **Programmazione dell'implementazione delle tecniche di sequenziamento di seconda generazione.** E' necessaria un'accorta programmazione, che parta dal censimento delle piattaforme già implementate e delle competenze già disponibili. Tale indagine è di interesse nazionale e può essere condotta utilizzando il questionario prodotto, ai sensi dell'Intesa 13/3/13 con il relativo progetto CCM (Definizione e promozione di programmi per il sostegno all'attuazione del Piano d'Intesa del 13/3/13 recante Linee di indirizzo su “La Genomica in Sanità Pubblica”). Il successivo piano di potenziamento, anche in relazione ai costi connessi, dovrà essere oggetto di uno specifico accordo Stato - Regioni.
- **Produrre, a partire dai documenti delle società scientifiche già disponibili e dalle indicazioni internazionali, linee-guida per l'utilizzo del sequenziamento.** L'implementazione di una capacità di sequenziamento evidentemente postula anche un suo appropriato utilizzo. Il Sistema Nazionale Linee Guida (SNLG) elabora raccomandazioni di comportamento clinico basate sugli studi scientifici più aggiornati, secondo il proprio metodo; è riconducibile a tale processo anche la collaborazione con società scientifiche ed esperti di settore. In tale *framework* di livello nazionale potrà essere prodotta una linea-guida per l'uso appropriato del sequenziamento; la successiva fase di implementazione è riconducibile alle responsabilità e metodi della programmazione e *management* dei servizi sanitari regionali e richiede un processo esplicito di recepimento e applicazione.

Raccomandazioni.

In accordo con le linee guida che la Società Italiana di Genetica Umana (SIGU) ha prodotto per dare elementi di indirizzo circa l'utilizzo dei test di sequenziamento di nuova generazione nell'ambito della Genetica Medica, si forniscono le seguenti raccomandazioni:

- ✓ La caratterizzazione fenotipica è fondamentale per la scelta della tecnica di diagnosi molecolare (sequenziamento Sanger, *Targeted resequencing*, WES) e per la successiva analisi delle varianti identificate.
- ✓ Nel caso di fenotipi specifici, caratterizzati da bassa eterogeneità genetica e coinvolgenti geni di piccole dimensioni, può essere opportuno ricorrere ad analisi con metodiche molecolari

convenzionali (ad esempio: sequenziamento Sanger, PCR mirata per mutazioni dinamiche). Anche la lunghezza del gene può influenzare la scelta della tecnica analitica da utilizzare. In generale, è auspicabile che l'analisi molecolare di geni molto grandi (numerosi esoni; per esempio NF1, CFTR, etc.) sia trasferita su piattaforme NGS per l'abbattimento dei costi e dei tempi di refertazione.

- ✓ Nel caso di condizioni con elevata eterogeneità genetica nelle quali mutazioni in un numero ridotto di geni sono responsabili della maggioranza dei casi è auspicabile l'uso di un *targeted resequencing* (pannelli di geni noti). Tale strategia è indicata anche in caso di sospetto mosaicismo.
- ✓ Nel caso di condizioni con eterogeneità genetica particolarmente marcata dove è coinvolto un numero sempre crescente di geni, ognuno dei quali è responsabile di una bassa percentuale di casi (per esempio paraparesi spastiche ereditarie, retiniti pigmentose, etc.) è indicata l'esecuzione di un WES con un filtro limitato all'analisi di un pannello di geni noti (pannello "in silico"). In caso di negatività dell'analisi di un pannello di geni, i dati esomici restano quindi a disposizione per le eventuali indagini successive indirizzate alla ricerca di nuovi geni candidati o per l'analisi di geni causativi identificati in un secondo tempo.
- ✓ Infine in tutti i casi in cui non può essere formulata un'ipotesi diagnostica su base clinica è preferibile l'analisi dell'intero esoma per l'individuazione del difetto genetico responsabile, che può riguardare mutazioni/geni già noti (ambito diagnostico) o nuovi geni candidati (ambito di ricerca) che necessitano di ulteriori conferme. E' auspicabile che tali indagini siano eseguite in centri con comprovata esperienza nell'ambito dell'analisi di dati esomici per garantire la più alta probabilità di successo, che al momento, secondo la letteratura medica, si attesta attorno al 25%.
- ✓ E' utile confermare sempre la mutazione identificata tramite metodica NGS con sequenziamento Sanger e stabilirne la segregazione nella famiglia quando possibile.

Tabella 1. Interventi identificabili

Argomento: capacità di sequenziamento		
	Responsabilità operativa	Indicatori per la valutazione di processo e di output
Intervento 1: <i>implementazione ed eventuale potenziamento piattaforme di NGS</i>		
Azioni .		
<ul style="list-style-type: none"> • Condurre <i>survey</i> 	intervento 'Centrale'	Disponibilità di risultati della <i>survey</i> : indicatore dicotomico S/N

<ul style="list-style-type: none"> Definire un piano di implementazione 	intervento Centrale e 'Regionale'	Definizione del piano: indicatore dicotomico S/N
		Percentuale sul totale delle regioni dei piani regionali implementati in ambito strutture pubbliche/accreditate
Intervento 2: <i>rendere disponibili linee guida per l'utilizzo del sequenziamento</i>		
Azioni		
<ul style="list-style-type: none"> Definire linee-guida 	intervento 'Centrale'	Disponibilità di linee-guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> Implementare linee-guida 	intervento 'Regionale'	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N

3.b Genomica nella diagnosi delle Malattie Complesse e Multifattoriali

Lo studio della variabilità interindividuale è definito dall'analisi della distribuzione e della frequenza dei geni nelle popolazioni. Lo sviluppo di questi studi ha fornito risposte a numerosi quesiti circa l'origine della nostra specie, le grandi migrazioni che hanno caratterizzato l'evoluzione dell'uomo moderno, il ruolo della selezione naturale nel mantenere le frequenze geniche nelle popolazioni e, sul piano applicativo, la comprensione di parte delle basi biologiche di molte malattie complesse e multifattoriali.

La variabilità genica della nostra specie è talmente elevata da definire mappe geografiche basate sulla frequenza di particolari alleli, ed è misurata attraverso il polimorfismo, cioè la percentuale di loci per i quali è presente più di un allele, e l'eterozigotità, cioè la percentuale di individui in una popolazione che porta alleli diversi nello stesso gene. Il valore medio di polimorfismo nei mammiferi è circa 15%, mentre l'eterozigotità è circa 4% se riferita alle proteine, ma è molto più elevata (>90%), se l'analisi è basata sul DNA. L'esistenza di questa straordinaria variabilità ha permesso di dimostrare che nella popolazione umana non esistono le razze. I polimorfismi sono indicatori della variabilità e perciò sono dei marcatori genetici. Le categorie più importanti di questi marcatori sono i gruppi sanguigni, le proteine del siero o dei globuli rossi, gli antigeni linfocitari, i polimorfismi del DNA. La disponibilità di questi sistemi consente di ottenere informazioni sull'evoluzione delle frequenze geniche, che cambiano nel tempo in rapporto all'effetto delle mutazioni, della migrazioni, della selezione naturale e della deriva genetica casuale.

La mutazione è un elemento chiave dell'evoluzione e la sua assenza determinerebbe l'arresto evolutivo di una specie. A meno che la quota di radiazioni a cui siamo esposti non aumenti considerevolmente o che un nuovo potente mutageno sia introdotto nella nostra dieta, è probabile che il tasso di mutazione per qualsiasi gene rimanga abbastanza costante (tasso di mutazione medio: 10^{-5} - 10^{-9}). Oggi si stima che il tasso reale di

mutazioni nell'uomo, stimato mediante il sequenziamento completo dei genitori e dei figli, sia di circa 75 nuove mutazioni per generazione. Analogamente, la deriva genetica non ha conseguenze in popolazioni estese, ma può invece, avere un effetto notevole sulle frequenze geniche, nelle piccole popolazioni.

Nel secolo scorso, di pari passo con la scoperta della struttura e della funzione del DNA, si è affermato il concetto che lo stato di salute e di malattia sono il risultato dell'interazione tra le caratteristiche genetiche e l'ambiente. Le tecniche di sequenziamento di seconda generazione stanno contribuendo a decodificare l'ereditabilità delle malattie complesse, anche se dopo una decina di anni di ricerche hanno definito mediamente, fatte salve alcune eccezioni, meno del 15% della loro componente genetica. Una possibile spiegazione di questa "ereditabilità mancante" è da attribuire certamente a valutazioni sovrastimate dell'ereditabilità calcolata su base empirica in quanto gli effetti ambientali intra-familiari non sono stati inclusi nel modello di calcolo o perché essi non potevano essere stimati. Inoltre, la variabilità della frequenza di molti polimorfismi nelle popolazioni hanno contribuito a "diluire" il peso dei singoli marcatori nel calcolo delle loro associazioni e, di conseguenza, la loro utilizzazione clinica. E' stato chiarito da uno studio effettuato sulla popolazione Islandese che una parte sostanziale dell'ereditabilità mancante è dovuta a variazioni polimorfiche rare, che non sono incluse nei pannelli di genotipizzazione utilizzati.

Per queste ed analoghe considerazioni è necessario utilizzare con cautela i polimorfismi genetici associati alle malattie complesse, valutare con attenzione la sensibilità e la specificità dei test genetici e perciò l'accuratezza di predizione del rischio utilizzando curve ROC (*Receiver-Operating Characteristic*) e definendo le conseguenti aree AUC (*Area Under the Curve*), che costituiscono la misura del potere discriminante del test. E' però importante osservare che anche la predizione AUC può avere una scarsa utilità clinica se la malattia è rara nella popolazione. Ad esempio, l'allele HLAB27 è fortemente associato al rischio di spondilite anchilosante, una rara forma di artrite cronica che colpisce mediamente 1-5% della popolazione. Nonostante il potere predittivo del biomarcatore in termini di specificità e sensibilità (99%), con una OR di circa 70, il rischio di sviluppare la malattia dopo un test HLAB27 positivo, è molto basso. Pur con queste limitazioni, non va ignorato che questo limitato potere predittivo è spesso assimilabile a quello con il quale oggi si calcola un rischio utilizzando nella clinica test non-genetici.

Sebbene le analisi della suscettibilità alla maggior parte dei fenotipi complessi appaiano al momento poco utilizzabili ai fini clinici, molti polimorfismi associati a malattie complesse, trovano interesse come biomarcatori genomici per definire la patogenesi delle malattie complesse (ad esempio malattie infiammatorie intestinali) e quali indicatori della risposta terapeutica. Ad esempio, l'allele C del polimorfismo rs8192675 del gene SLC2A2, che codifica per un trasportatore del glucosio, presenta una correlazione positiva con l'efficacia della metformina nel ridurre i livelli di emoglobina glicosilata, influenzando direttamente l'espressione del gene SLC2A nel fegato. Per questo viene considerato un potenziale marcatore di medicina personalizzata. Questo esempio illustra come, nel breve periodo, le analisi *genome wide (GWA)*, integrate con quelle di espressione genica estesa (*Genome-Wide Expression - GWE*) e di epigenomica (*Epigenome-Wide Association Studies, EWAS*) potrebbero diventare uno strumento privilegiato per l'identificazione di una serie di biomarcatori genomici fondamentali per la medicina personalizzata o di precisione. Questi approcci integrativi e convergenti consentono infatti di definire network biologici di geni e proteine, che, attraverso l'analisi bioinformatica di banche-dati disponibili, potrebbero modificare lo scenario diagnostico e terapeutico delle patologie multifattoriali.

Obiettivi e Raccomandazioni

Da quanto esposto emergono le seguenti priorità, rispetto alle quali sono identificabili i relativi interventi (Tabella 2):

- **Garantire l'uso appropriato dei polimorfismi nella pratica clinica.** Poiché bisogna utilizzare con cautela i polimorfismi genetici associati a malattie complesse, e considerando, d'altra parte, il grande potenziale di nuove conoscenze che caratterizza la ricerca in questo campo, è necessario che l'uso clinico delle analisi genomiche applicato alle malattie complesse sia sostenuto da chiare indicazioni basate sull'evidenza. È quindi necessario prevedere sia un'accurata valutazione del loro uso nella clinica, sia un loro continuo aggiornamento in base alle evidenze scientifiche prodotte; ciò è conseguibile mediante la produzione di linee-guida con una funzione di *quick-review* periodica della letteratura sia primaria che secondaria; tale funzione dovrebbe essere assicurata dal network HTA previsto nel Cap. 6.

Tabella 2. Interventi identificabili

Argomento: <i>polimorfismi nella pratica clinica relativamente alle malattie complesse</i>		
	Responsabilità operativa	Indicatori per la valutazione di processo e di output
Intervento 1: <i>rendere disponibili linee guida per l'uso dei polimorfismi nella pratica clinica relativamente alle malattie complesse</i>		
Azioni		
• Definire linee-guida	intervento 'Centrale'	Disponibilità di linee-guida: indicatore dicotomico S/N
• Implementare linee-guida	intervento 'Regionale'	Recepimento regionale Linee-guida : indicatore dicotomico S/N
Intervento 2: <i>programmare un rapporto periodico di aggiornamento delle linee-guida</i>	Intervento 'Centrale'	Disponibilità almeno annuale del report: indicatore dicotomico S/N

3.c Tumori

3.c.i *Mutazioni germinali*

I tumori ereditari rappresentano solo una piccola frazione di tutti i tumori (1-10%). La ricerca di mutazioni germinali è funzionale all'identificazione di un aumentato rischio familiare, è un percorso da sviluppare

correttamente tramite la Consulenza Genetica Oncologica (CGO) ed è strettamente focalizzato alla prevenzione e all'analisi precoce della malattia. La sua applicabilità è quindi nell'individuazione preventiva di pazienti sani con un aumentato rischio per patologie oncologiche quali ad esempio il carcinoma della mammella e dell'ovaio, il carcinoma del colon, la sindrome di Lynch.

Il numero di geni responsabili di forme di predisposizione ereditaria al cancro è in continua crescita e attualmente se ne conoscono quasi un centinaio, implicati in una cinquantina di diverse sindromi, ciascuna delle quali presenta le sue specificità, legate alla sede e tipologia dei tumori.

Nella maggior parte dei pazienti la predisposizione viene ereditata con modalità autosomica dominante con penetranza incompleta e interessa un gene oncosoppressore. In questi casi la cancerogenesi segue il modello *two-hits*, per cui la prima mutazione è ereditata mentre la seconda, somatica, disattiva l'altro allele. Viceversa nelle forme tumorali sporadiche entrambe le mutazioni devono avvenire a livello somatico. Noto anche come "ipotesi di Knudson", questo modello è stato formulato la prima volta più di 40 anni fa per spiegare l'origine del Retinoblastoma, un raro tumore infantile della retina, ma viene oggi esteso a moltissime altre forme tumorali ereditarie (ad esempio geni APC, PTEN, p53, VHL, NF1, NF2).

Anche alcuni geni della riparazione del DNA trasmettono la predisposizione con analogo meccanismo autosomico dominante, in accordo con il suddetto modello (ad esempio geni Mismatch Repair-MMR, BRCA1, BRCA2). Meno frequentemente l'ereditarietà imputabile ad essi è autosomica recessiva (ad esempio gene MUTYH del sistema Base Excision Repair-BER).

Numerose sono inoltre le sindromi da instabilità genetica, spesso associate allo sviluppo di tumori, con ereditarietà di tipo autosomico recessivo legate a mutazioni in geni appartenenti a diversi sistemi di riparazione e/o di controllo dell'integrità del DNA (ad esempio geni FANC, BLM, ATM, geni XP del sistema Nucleotide Excision Repair-NER). Le rare forme di predisposizione dovute a oncogeni sono invece sempre dominanti (ad esempio geni RET, KIT, MET).

Nella Tabella 3 sono riportati alcuni esempi relativi ad alcune tra le sindromi di predisposizione al cancro più note, le principali manifestazioni cliniche (tumorali e non), le modalità di trasmissione (AD, autosomico dominante; AR, autosomico recessivo) e i geni coinvolti.

Tabella 3. Esempi relativi ad alcune sindromi di predisposizione al cancro

Sindrome/malattia	Patologia	Trasmissione	Gene (i)
Retinoblastoma ereditario	Retinoblastoma	AD	Rb
Poliposi Adenomatosa Familiare (FAP)	Adenomi colo-rettali, cancro colo-rettale, adenomi gastroduodenali	AD	APC
Sindrome Li-Fraumeni	Sarcomi, cancro mammella, tumori cerebrali, carcinoma surrene	AD	P53
Sindrome di Cowden	Cancro mammella, cancro tiroide	AD	PTEN
Neurofibromatosi	Neurofibromi, gliomi, schwannomi, meningiomi, leucemie, macchie <i>cafe-au-lait</i>	AD	NF1, NF2
Von Hippel-Lindau	Tumore renale, feocromocitoma, angiomi	AD	VHL
Sindrome di Lynch (HNPCC)	Cancro colo-rettale, cancro endometrio	AD	MSH2, MLH1, MSH6, PMS2, EPCAM

Cancro Mammella e Ovaio Ereditario	Cancro mammella, cancro ovarico	AD	BRCA1, BRCA2
Poliposi MUTYH-Associata (MAP)	Polipi colo-rettali, cancro colo-rettale	AR	MUTYH
Anemia di Fanconi	Pancitopenia, leucemia acuta, tumori solidi, malformazioni varie	AR	FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1 (BRCA2), FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL
Sindrome di Bloom	Eritema, diabete, ipogonadismo, leucemie, tumori solidi	AR	BLM
Atassia-Telengectasia	Atassia, telengectasie, linfomi, leucemie linfatiche B	AR	ATM
Xeroderma Pigmentoso	Lesioni cutanee da ipersensibilità UV, carcinomi epiteliali	AR	XPA, XPB, XPC, XPD, XPE, XPF, XPG, XPV
Neoplasia Endocrina Multipla di tipo 2	Carcinoma midollare tiroide, feocromocitoma, adenomi paratiroide	AD	RET
GIST ereditari	Tumori stromali gastrointestinali	AD	KIT
Carcinoma delle cellule renali papillare ereditario (HPRCC)	Tumori renali	AD	MET

Nel caso specifico di ricerca di una mutazione in pazienti già affetti da patologia oncologica il test per le mutazioni germinali oggi è uno strumento utile per stimare il rischio di secondi tumori e per screenare i consanguinei al fine di attuare strategie preventive. Inoltre il test genetico può oggi consentire una terapia personalizzata, come ad esempio nel caso dei nuovi farmaci quali i PARP inibitori che hanno mostrato efficacia nelle pazienti con carcinoma ovarico BRCA mutato.

3.c.ii *Mutazioni somatiche*

La maggior parte dei tumori sono sporadici e contraddistinti esclusivamente da mutazioni acquisite nel corso della vita, a carico di oncogeni, oncosoppressori e geni della riparazione del DNA.

Gli oncogeni sono geni cellulari dotati di proprietà oncogene trasformanti; si tratta spesso di sequenze di DNA omologhe, cioè molto simili, a sequenze “v-*onc*” presenti in alcuni Retrovirus, ossia in virus a RNA capaci di causare tumori in animali. Gli oncogeni vengono classificati in base a localizzazione cellulare e funzione del loro prodotto proteico in:

- ✓ fattori di crescita
- ✓ recettori per fattori di crescita
- ✓ trasduttori intracellulari
- ✓ fattori di trascrizione nucleare e inibitori dell'apoptosi (morte cellulare).

I geni oncosoppressori hanno la funzione di “sopprimere” una proliferazione cellulare inappropriata o, più in generale, la trasformazione neoplastica. Hanno quindi funzioni opposte a quelle degli oncogeni. In condizioni normali, i processi di proliferazione, differenziamento e morte cellulare sono il risultato di un delicato equilibrio

che deriva dall'azione bilanciata di entrambe le categorie di geni, oncogeni e oncosoppressori. La mutazione di una singola copia dell'oncosoppressore consente ancora il funzionamento del gene a livelli sufficienti e quindi non è associato allo sviluppo del tumore, mentre il danneggiamento o la perdita di entrambe le copie determina invece la "*loss of function*", ossia l'inattivazione completa della sua funzione che induce perciò la comparsa del tumore.

I geni della riparazione del DNA sono in grado di determinare, quando alterati, un aumento del tasso di mutazione e/o un'instabilità genetica che facilita l'acquisizione progressiva di mutazioni in oncogeni e oncosoppressori che portano allo sviluppo di un tumore. A differenza dei geni precedenti, essi hanno quindi un ruolo indiretto nella genesi del cancro: la mutazione di un gene mutatore determina infatti una perdita della sua funzione riparativa e quindi del meccanismo di controllo sulla stabilità del materiale genetico che è essenziale per uno sviluppo normale delle cellule.

L'identificazione nei tumori di alcune anomalie genetiche, soprattutto quelle a carico degli oncogeni, è importante in termini di diagnosi, prognosi e terapia. Ad esempio la traslocazione 9;22 che attiva l'oncogene *abl* e che comporta la formazione di un cromosoma 22 anomalo (detto cromosoma Philadelphia) è specifica della leucemia mieloide cronica ed è fondamentale per fare correttamente questa diagnosi. Inoltre, il monitoraggio del midollo osseo mediante citogenetica o analisi molecolare può documentare il raggiungimento e la persistenza della guarigione o, alternativamente, può diagnosticare precocemente la ripresa della malattia. L'amplificazione di alcuni oncogeni, quali ad esempio N-MYC (nel neuroblastoma) e HER-2 (nel carcinoma della mammella e dello stomaco), è riscontrata spesso in fasi avanzate di malattia ed ha significato prognostico negativo. Infine, molti sforzi vengono oggi rivolti alla *target therapy* per lo sviluppo di farmaci mirati che agiscono in maniera specifica sulle proteine alterate o iperespresse prodotte da un oncogene attivato, quali ad esempio Imatinib (inibitore di *abl*) nella leucemia mieloide cronica e Trastuzumab e Pertuzumab (anticorpi anti-HER2) nel carcinoma mammario, Cetuximab e Panitumumab nel carcinoma del colon RAS *wild type*, Gefitinib e altri TKI nell'adenocarcinoma del polmone con mutazione di EGFR.

Obiettivi e Raccomandazioni

Da quanto esposto emergono le seguenti priorità, rispetto alle quali sono identificabili i relativi interventi (Tabella 4):

- **Test per le mutazioni germinali.** La ricerca di mutazioni germinali è funzionale all'identificazione di un aumentato rischio familiare, è un percorso da sviluppare correttamente tramite la Consulenza Genetica Oncologica ed è strettamente focalizzato alla prevenzione e all'analisi precoce della malattia. Quindi, la somministrazione di test per le mutazioni germinali oggi è uno strumento utile per stimare il rischio di secondi tumori e per screenare i consanguinei al fine di attuare strategie preventive. A questo riguardo v.4.3.i. Inoltre il test genetico può oggi consentire una terapia personalizzata, come ad esempio nel caso dei nuovi farmaci quali i PARP inibitori che hanno mostrato efficacia nelle pazienti con carcinoma ovarico BRCA mutato. A questo riguardo v 5.b.
- **Test per le mutazioni somatiche.** L'identificazione nei tumori di alcune anomalie genetiche, soprattutto quelle a carico degli oncogeni, è importante in termini di diagnosi, prognosi e terapia. Poiché bisogna utilizzare appropriatamente tali test, e considerando, d'altra parte, il grande potenziale di nuove conoscenze che caratterizza la ricerca in questo campo, è necessario che l'uso clinico di tali test sia sostenuto da chiare indicazioni *evidence-based*. È quindi necessario prevedere sia

un'accurata valutazione di utilizzabilità clinica sia un suo tempestivo aggiornamento in base alle evidenze scientifiche prodotte. Il SNLG elabora raccomandazioni di comportamento clinico basate sugli studi scientifici più aggiornati, secondo il proprio metodo; è riconducibile a tale processo anche la collaborazione con società scientifiche ed esperti di settore. In tale *framework* di livello nazionale potrà essere prodotta una linea-guida per l'uso appropriato dei test per le mutazioni somatiche nonché una *quick-review* periodica della letteratura sia primaria che secondaria; tale funzione dovrebbe essere assicurata dal network HTA previsto nel Cap. 6.

Tabella 4. Interventi identificabili

Argomento: Tumori - mutazioni germinali		
	Responsabilità operativa	Indicatori per la valutazione di processo e di output
Intervento 1: <i>test per le mutazioni germinali per stimare il rischio di secondi tumori e per screenare i consanguinei al fine di attuare strategie preventive</i>	<i>Vedi cap- 4.3.i</i>	
Argomento: Tumori - mutazioni somatiche		
Intervento 1: <i>rendere disponibili linee guida per l'utilizzo appropriato dei test per mutazioni somatiche</i>		
<ul style="list-style-type: none"> Definire linee-guida 	intervento 'Centrale'	Disponibilità di linee-guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> Implementare linee-guida 	intervento 'Regionale'	Recepimento Regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N
Intervento 2: <i>programmare un rapporto periodico di aggiornamento delle linee-guida</i>	intervento 'Centrale'	Disponibilità almeno annuale del report: indicatore dicotomico S/N

Bibliografia.

1. Società Italiana di Genetica Umana (SIGU). Il sequenziamento del DNA di nuova generazione: indicazioni per l'impiego clinico. Disponibile su: <http://www.sigu.net/show/documenti/5/1/linee%20guida>
2. Yang Y et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med.* 2013 Oct 17;369(16):1502-11.
3. Lee H et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA.* 2014 Nov 12;312(18):1880-7.
4. Yang Y et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA.* 2014 Nov 12;312(18):1870-9.
5. Zaitlen N et al. Using extended genealogy to estimate components of heritability for 23 quantitative and dichotomous traits. *PLoS Genet.* 2013 May;9(5):e1003520
6. Zhou K et al. Variation in the glucose transporter gene *SLC2A2* is associated with glycemic response to metformin. *Nat Genet.* 2016 Sep;48(9):1055-9.

CAPITOLO 4

La prevenzione personalizzata.

4.a. Test preconcezionali

La prevenzione delle malattie mendeliane da tempo utilizza lo screening dei “portatori sani” per intercettare le coppie a rischio di malattie recessive comuni o per le quali esiste nella famiglia uno specifico rischio (cosiddetto screening a cascata). Un esempio illustrativo è la prevenzione della beta talassemia omozigote, la cui incidenza è stata drasticamente abbattuta in varie aree del mondo, combinando lo screening degli eterozigoti con la consulenza genetica e la diagnosi prenatale. Negli ultimi anni si è proposto di allargare la ricerca dei portatori anche per altre malattie recessive comuni, come la fibrosi cistica (FC), causata dalle mutazioni del gene CFTR. L’offerta attiva dello screening a cascata tra i fratelli e le sorelle di una persona affetta da una *malattia recessiva* appare giustificato solo per le condizioni che hanno una frequenza non inferiore a 1:10.000 nella popolazione, il che corrisponde ad una frequenza di eterozigoti di almeno 1:50. Di regola tale screening non è giustificato per i consanguinei più remoti, se la frequenza della malattia non è elevata nella popolazione.

Negli Stati Uniti, *l’American College of Obstetrics and Gynecology (ACOG)* e *l’American College of Medical Genetics (ACMG)* hanno raccomandato di offrire questo screening alle coppie che intendono affrontare una gravidanza. Il test, inoltre, viene offerto dalla sanità pubblica in Israele nell’ambito di un pannello di diagnosi genetiche. Esistono comunque diverse altre esperienze di screening genetico limitate a piccoli gruppi, per la ricerca degli eterozigoti per la FC ed altre malattie genetiche. Gli obiettivi di queste raccomandazioni sono il miglioramento della consapevolezza procreativa e/o la riduzione dell’incidenza delle malattie sottoposte allo screening.

Oggi è in forte espansione l’offerta dei test genetici diretti ai consumatori, favorita dalla disseminazione di informazioni attraverso internet. In alcune aree geografiche il test del portatore della FC è relativamente diffuso, per l’adesione spontanea all’offerta che proviene da laboratori pubblici e privati, anche se non viene raccomandato dalle società scientifiche e neppure promosso dalle autorità sanitarie. Per quanto riguarda l’Italia, si stima che negli ultimi 20 anni siano stati eseguiti nel Veneto oltre 130.000 test per lo screening dei portatori della FC, una campagna a cui ha fatto seguito una significativa diminuzione dell’incidenza della malattia. Analogamente, negli Stati Uniti, dopo le raccomandazioni della ACOG-ACMG a favore dello screening della mutazione più comune (F508del), si è registrata una significativa riduzione dell’incidenza della malattia. Ovviamente si tratta di un approccio mirato all’analisi di specifici geni-malattia, che non incide sulla frequenza delle altre malattie recessive.

L’introduzione delle tecnologie NGS consente, in teoria, di verificare, nelle coppie che vogliono avviare una gravidanza, la condizione di portatore per una specifica malattia mendeliana, oppure escludere la presenza di mutazioni in geni responsabili di malattie dominanti a penetranza incompleta o espressività variabile, non diagnosticate clinicamente.

Il primo scenario è esemplificato dall’analisi delle mutazioni del gene CFTR, (www.genet.sickkids.on.ca). Molte variazioni nella sequenza di questo gene non hanno significato patogenetico; per altre non è chiaro il rapporto con la malattia. Nessun metodo commerciale permette oggi di identificare tutte le mutazioni del gene malattia la cui frequenza varia significativamente a livello geografico.. Questo problema sta diventando rilevante in

alcune regioni italiane per la costante crescita della multiethnicità. Sono invece disponibili test commerciali di primo livello per la ricerca delle mutazioni più frequenti di CFTR che garantiscono in Italia una *detection rate* del 70-90%. Alcuni laboratori utilizzano metodi sviluppati in casa, in grado di ridurre i costi. Un risultato negativo di questi test non esclude la presenza di mutazioni non ricercate. Il rischio residuo può essere quantificato in base alla frequenza delle mutazioni nella popolazione in esame e alla *detection rate* del test. Questo limite ha rappresentato finora una delle principali obiezioni alla raccomandazione dello screening del portatore nella popolazione generale, data la particolare difficoltà di spiegare adeguatamente il significato di un test negativo.

Le tecniche NGS hanno migliorato la sensibilità e già oggi hanno costi minori e potrebbero in futuro essere utili per lo screening di popolazione per diverse malattie a maggiore incidenza. La loro evoluzione tecnologica è rapida, ma il loro limite sta nella loro capacità di evidenziare variazioni di sequenza al momento di significato clinico non noto. Ciò comporta da un lato il ricorso ad un grande numero di consulenze genetiche complesse, e dall'altro lato il rischio di una mancata comprensione da parte dei probandi e/o dei medici curanti dei risultati del test, un aumento del numero dei test nei partner, l'esecuzione di indagini prenatali non interpretabili e l'ansia dei futuri genitori che si troverebbero a prendere decisioni riproduttive in assenza di informazioni certe o affidabili. A tutto ciò si deve aggiungere che persino nel caso delle mutazioni delle quali è nota l'associazione con la malattia non è sempre possibile predire, a livello individuale, la gravità del quadro clinico, in quanto l'effetto modulante di altri geni e dell'ambiente può dare origine a fenotipi variabili.

Per altre malattie recessive ad elevata frequenza sono disponibili evidenze che giustificerebbero l'introduzione delle tecniche NGS nella pratica clinica, come dimostra il caso dell'atrofia muscolare spinale o della distrofia muscolare di Duchenne/Becker. Le tecnologie NGS hanno maggiore sensibilità rispetto alle tecniche tradizionali e abbattano i tempi ed i costi dei test di screening dei portatori di mutazioni associate a malattie mendeliane eterogenee, come la sindrome di Alport.

Gli altri scenari, ovvero la ricerca simultanea di mutazioni in diversi geni responsabili di malattie recessive, oppure la ricerca di mutazioni ipomorfe in malattie dominanti, non trovano ancora sufficiente supporto dai dati della letteratura. Se è vero che le tecniche NGS consentono in linea teorica di intercettare i portatori sani per le malattie recessive di cui sono note le basi molecolari, di fatto l'estensione dello screening preconcezionale alla maggior parte dei geni delle malattie gravi è considerato finora impraticabile, anche se esistono prove di concetto che indicano, in prospettiva, la possibilità di introdurlo nella pratica sanitaria.

In conclusione i test che hanno come oggetto lo screening dei portatori di mutazioni genetiche responsabili di malattie recessive comuni, come la fibrosi cistica, sono altamente attendibili e sono facilmente eseguibili con le tecniche tradizionali. Esistono quindi le condizioni per la loro implementazione, una volta che sia garantita la qualità e la disponibilità della consulenza genetica e siano avviate campagne di informazione a livello di popolazione. La prevedibile evoluzione delle tecnologie NGS amplierà le possibilità di screening dei portatori di geni associati a molte malattie genetiche. Tuttavia, l'eventuale implementazione di programmi di screening di questo tipo dovrà essere testata su programmi pilota.

Obiettivi e Raccomandazioni

Da quanto esposto emergono le seguenti priorità, rispetto alle quali sono identificabili i relativi interventi (Tabella 5):

- **Programmazione dell'Implementazione delle piattaforme NGS** (tale priorità è già definita nel Cap. 3.a)
- **Promuovere programmi evidence-based di screening dei portatori di mutazioni genetiche responsabili di malattie recessive comuni.** La disponibilità di sufficienti evidenze scientifiche mette il Sistema Sanitario in condizione di inserire tale screening in modo sistematico nell'ambito dei servizi offerti alla popolazione di riferimento (come definita dalle Linee-guida: v. dopo). Si identifica quindi un intervento di sanità pubblica con le seguenti caratteristiche: basato su valutazioni di efficacia sperimentale; organizzato per profili di assistenza e quindi non soltanto delegato alla competenza /sensibilità/ iniziativa tecnico-professionale; mirato all'equità e quindi basato sul coinvolgimento attivo della popolazione destinataria; dotato di un esplicito sistema informativo e di valutazione.
Il processo di trasferimento delle nuove conoscenze scientifiche nella pratica, impone la sua articolazione nelle seguenti fasi:
 - Produzione di linee guida per screening dei portatori di mutazioni genetiche responsabili di malattie recessive comuni. Il Sistema nazionale linee guida (SNLG) elabora raccomandazioni di comportamento clinico basate sugli studi scientifici più aggiornati, secondo il proprio metodo; è riconducibile a tale processo anche la collaborazione con società scientifiche ed esperti di settore. In tale *framework* di livello nazionale potrà essere prodotta una linea-guida per l'uso appropriato dello screening.
 - La successiva fase di implementazione è riconducibile alle responsabilità e metodi della programmazione e management dei servizi sanitari regionali e richiede un processo esplicito di recepimento e applicazione.
 - Organizzazione di un percorso. Assunto che la linea-guida riguarda per definizione la dimensione tecnico-professionale, le raccomandazioni derivate dalla LG devono portare alla implementazione di un'organizzazione in grado di accogliere la popolazione target in un percorso esplicito, basato su 'nodi organizzativi' chiaramente definiti e procedure di 'ingaggio' precise ed esplicite. Si tratta quindi di definire un percorso diagnostico- terapeutico-assistenziale (PDTA: *sequenza predefinita, articolata e coordinata di prestazioni, ambulatoriali e/o di ricovero, che prevede la partecipazione integrata di diversi specialisti e professionisti, al fine di realizzare la diagnosi e la terapia più adeguate per una specifica patologia. Questo contesto comprende l'identificazione nel territorio regionale delle strutture/risorse responsabili dei vari step del percorso*) che prenda in carico gli individui destinatari dello screening.
- **Progetti pilota di screening dei portatori di geni associati a (molte) malattie genetiche (con tecnologia NGS).** La forza delle evidenze scientifiche relative allo screening dei portatori di geni associati a molte malattie genetiche è ritenuta sufficiente per proporre un intervento sulla popolazione target. Tuttavia le modalità organizzative e, complessivamente la sua fattibilità devono ancora essere definite e valutate; inoltre, le patologie 'bersaglio' di tale intervento devono essere accuratamente definite. Per tali motivi è richiesta la definizione di una linea-guida (nell'ambito già sopra ricordato del SNLG) e relativamente a questa è opportuno, per la sua implementazione, organizzare progetti pilota accuratamente disegnati e valutati.

- **Campagne di informazione.** Come espresso nel Capitolo 7, nella attuale fase di sviluppo dell'uso delle scienze omiche, si tratta prioritariamente di sviluppare una vera e propria *literacy* sia del personale non specializzato del SSN sia della popolazione piuttosto che programmare direttamente l'uso dei media di massa. Pertanto le esigenze divulgative ed informative sull'uso appropriato dei test preconfezionali di carattere genomico vanno perseguite con le strategie e metodologie previste nel cap 7.

Tabella 5. Interventi identificabili

Argomento: test preconfezionali		
	Responsabilità operativa	Indicatori per la valutazione di processo
Intervento 1: <i>screening dei portatori di mutazioni genetiche responsabili di malattie recessive comuni</i>		
Azioni .		
<ul style="list-style-type: none"> • Definire linee-guida 	intervento 'Centrale'	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> • Implementare linee-guida 	intervento 'Regionale'	Recepimento Regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> • Definire PDTA 	intervento 'Regionale'	Definizione del PDTA da parte della Regione: indicatore dicotomico S/N
		Casi trattati all'interno del PDTA: indicatore quantitativo Percentuale sul totale delle prestazioni eseguite in ambito strutture pubbliche/accreditate
Intervento 2: <i>Progetto pilota di screening dei portatori di geni associati a molte malattie genetiche</i>	Centrale/Regionale	
Azioni		

<ul style="list-style-type: none"> Definire linee-guida 	intervento 'Centrale'	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> Attuare progetto/i pilota 	Centrale/Regionale	Attuazione di almeno uno studio pilota: indicatore dicotomico S/N

4.b Test Prenatali

Le tecniche di diagnosi prenatale comprendono indagini strumentali e di laboratorio sviluppate negli ultimi 50 anni, con l'obiettivo di monitorare il concepito, a partire dalle prime fasi dello sviluppo embrionale fino ai momenti che precedono il parto.

L'**ecografia prenatale** è la tecnica non invasiva di diagnosi prenatale più importante e diffusa. Viene impiegata per monitorizzare lo sviluppo dell'embrione e del feto, verificarne il benessere, seguire l'evoluzione della gravidanza e come supporto alle indagini invasive che prevedono l'acquisizione dei tessuti fetali. La sua non invasività e l'elevato grado di risoluzione ottenuta con le apparecchiature di ultima generazione ne giustificano la straordinaria diffusione ed il suo impiego sistematico, nei paesi industrializzati, pressoché in tutte le gravidanze. Le sue potenzialità correlano con l'epoca gestazionale in cui viene utilizzata, la risoluzione dell'apparecchiatura e l'esperienza dell'operatore.

L'**amniocentesi** è la tecnica invasiva di diagnosi prenatale maggiormente utilizzata ed è finalizzata all'acquisizione, mediante puntura transaddominale, sotto controllo ecografico, del liquido amniotico, idealmente attorno alla XV-XVI settimana di amenorrea. Il rischio di aborto, collegato all'invasività della tecnica è calcolato in circa 1:200, ma varia in rapporto all'esperienza dell'operatore. Il liquido amniotico contiene una parte non corpuscolata, cioè priva di cellule, che viene isolata, per centrifugazione del campione, ed una parte corpuscolata, formata dagli amniociti, le cellule che derivano dalla cute, dalle mucose, dalle vie genito-urinarie, dall'apparato gastrointestinale del feto e dalle membrane amniotiche. Sulla porzione non corpuscolata è possibile dosare l'*alfafetoproteina (AFP)* ed, eventualmente, altri marcatori biochimici, mentre gli amniociti si utilizzano, in primo luogo, per le analisi citogenetiche, ed eventualmente quelle molecolari e biochimiche, sia direttamente che sulle cellule coltivate.

La **villocentesi** è una tecnica invasiva, utilizzata per il prelievo del trofoblasto mediante puntura transaddominale, sotto controllo ecografico, idealmente attorno alla X-XII settimana di amenorrea. Il rischio di aborto, collegato all'invasività della tecnica, è circa 2-3%, ma varia significativamente in rapporto all'esperienza dell'operatore. Il tessuto acquisito può essere utilizzato per l'analisi citogenetica, direttamente sulle cellule del citotrofoblasto o sulle colture (cellule mesenchimali del villo). L'uso combinato delle due tecniche fornisce informazioni su popolazioni cellulari che hanno un'origine embrionale diversa, consentendo, nella maggior parte dei casi, di risolvere il potenziale problema delle discrepanze tra il cariotipo placentare ed il cariotipo fetale (riscontrabile in circa il 2% dei campioni), che è riconducibile ad una condizione di mosaicismi postzigotico. La villocentesi permette di acquisire materiale biologico in quantità relativamente abbondanti ed è perciò la tecnica di elezione per la diagnosi molecolare dei geni-malattia e per le analisi

biochimiche. La precocità della tecnica, rispetto all'amniocentesi, è controbilanciata dalla sua maggiore invasività e dall'acquisizione di tessuto placentare e non fetale.

La **cordocentesi** è la tecnica di acquisizione del sangue fetale, per puntura transaddominale, attorno alla XVIII settimana di amenorrea. Il rischio di aborto, collegato all'invasività della tecnica, è circa 2%, ma varia significativamente in base all'esperienza dell'operatore. La tecnica è fortemente in disuso, essendo utilizzata soprattutto per monitorizzare alcune patologie infettive ed eventualmente per tentare di chiarire dubbi emersi dall'analisi citogenetica sugli amniociti.

Gli **screening prenatali non invasivi**, sviluppati negli ultimi 40 anni, si basano essenzialmente sull'analisi di marcatori biochimici sul sangue materno, combinati con le indagini ecografiche. Il prototipo di queste analisi è il dosaggio dell'AFP, inizialmente utilizzato come marcatore dei difetti del tubo neurale (valore aumentato) e, successivamente, della sindrome di Down (SD; valore ridotto). Con il tempo questi screening, basati sull'associazione di marcatori diversi, hanno ottenuto un crescente sviluppo nel calcolo della probabilità delle aneuploidie fetali, soprattutto nelle madri che rientravano nella fascia di età a bassa probabilità di patologia cromosomica nel feto, e perciò non candidate al monitoraggio invasivo della gravidanza. Il *triplo-test* (o *tri-test*) basato sul dosaggio, nel secondo trimestre, dell'AFP, della gonadotropina corionica e dell'estriolo non coniugato, combinato con l'età materna e con l'età gestazionale misurata ecograficamente, consentiva di predire circa il 65% delle SD, con una percentuale di falsi positivi (FPR) compresa tra il 5 ed il 10%. A questo protocollo ne sono stati affiancati nel tempo numerosi altri, basati su vari marcatori, in diverse combinazioni, e sull'anticipazione dello screening dal secondo al primo trimestre. Parallelamente, i marcatori biochimici sono stati integrati con quelli ecografici, in particolare l'analisi dello spessore della cute nucale (*translucenza nucale* - *TN*), che, sebbene non patognomonico della SD, tra l'XI e la XIV settimana di amenorrea, diagnostica circa il 75% dei casi, con una FPR del 5%. Successivamente, si è affermato il *bi-test*, che utilizza il sangue materno acquisito attorno alla X-XI settimana, sul quale viene dosata la frazione libera della beta gonadotropina corionica ed una glicoproteina ad elevato peso molecolare, la *Pregnancy Associated Plasma Protein A* (PAPP-A). Questa analisi, integrata con la misurazione della TN e l'età materna, predice circa l'80% delle SD, con una percentuale di falsi positivi pari a circa il 6%. In questo contesto va considerato anche il test contingente (TN + marker biochimici a 11-13 settimane; marker ecografici a 12-13 settimane o biochimici a 14-16 settimane nei gruppi a probabilità intermedia), che consente di migliorare la specificità del test.

4.b.1 Diagnosi prenatale non invasiva sul DNA fetale presente nel circolo materno: il *Non Invasive Prenatal Testing* (NIPT)

E' stato dimostrato che, a partire dal I trimestre di gravidanza, è presente nel circolo ematico materno DNA libero (*cell free fetal DNA*, cfDNA), parte del quale è di origine fetale (*cell free fetal DNA*, cffDNA), che può essere recuperato in maniera non-invasiva ed utilizzato per lo screening di alcune patologie fetali. Il cfDNA origina dalla lisi delle cellule materne e placentari. I frammenti di DNA fetale degradato contengono mediamente 180 paia di basi (bp) e sono sospesi nel plasma arterioso. Il cffDNA può essere isolato a partire dalla X settimana, quando raggiunge quantità sufficienti per un potenziale impiego clinico. La sua percentuale può variare tra <4%, una quantità non utile per lo screening, a circa il 40%, con una media del 10%, alla XII settimana, quando il 90% circa dei frammenti di DNA libero circolante nel plasma originano dall'apoptosi degli epitelii materni, creando una commistione di cfDNA materno e cffDNA. Il cffDNA scompare dal circolo materno poche ore dopo il parto, probabilmente per escrezione renale.

Il cfDNA viene utilizzato nei protocolli di *Non Invasive Prenatal Testing* (NIPT), soprattutto per lo screening delle aneuploidie cromosomiche. Indipendentemente dalla tecnica utilizzata, l'analisi si basa su comparazioni. Ad esempio, nel caso del cromosoma 21 (CR21), la tecnica confronta il numero dei frammenti del CR21 nella gravidanza in esame, con il numero dei frammenti di un altro cromosoma dello stesso campione atteso in una condizione di disomia, oppure con quelli di un pool di gravidanze disomiche (due CR21) di riferimento. Se il campione ottenuto dalla gravidanza in esame contiene due coppie di CR21 (due della madre e due del feto), il rapporto tra i conteggi (numero dei frammenti del CR21 nel test/numero dei frammenti nei campioni di riferimento disomici) è all'incirca uguale a 1. Se nella gravidanza in esame è presente un feto con trisomia 21 (T21), aumenta la frazione fetale (FF) per la presenza di frammenti circolanti aggiuntivi rilasciati dal CR21 soprannumerario del feto. L'entità dell'aumento dipende dalla percentuale della FF totale e dal numero delle bp del CR21, in rapporto alle bp del genoma complessivo del feto.

In circa il 2% dei diversi campioni analizzati attorno alla XII settimana la FF non supera la soglia del 4% e pertanto non sono idonei per lo screening. E' possibile che in questi campioni la percentuale delle patologie cromosomiche sia significativamente più elevata, rispetto a quella dei campioni con $FF \geq 4\%$.

Il NIPT non differenzia il DNA feto-placentare da quello materno. Pertanto non è un test diagnostico, ma di screening, che, mediante algoritmi dedicati, definisce la probabilità che il feto sia affetto da una delle principali trisomie autosomiche (trisomia 21 [T21], trisomia 18 [T18], trisomia 13 [T13]) o da un'aneuploidia dei cromosomi sessuali (X, XXX, XXY, XYY), analizzando selettivamente, nel cfDNA, il numero dei frammenti contribuiti da ciascuno dei cromosomi oggetto del test.

Una recente metanalisi ha riportato, per le tre principali aneuploidie autosomiche, nelle gravidanze singole, le seguenti percentuali di sensibilità (*detection rate* - DR) e di specificità (FPR) del NIPT:

- T21 - DR 99,2% (95% CI, 98,5-99,6%); FPR 0,09% (95% CI, 0,05-0,14%)
- T18 - DR 96,3% (95% CI, 94,3-97,9%); FPR 0,13% (95% CI, 0,07-0,20%)
- T13 - DR 91,0% (95% CI, 85,0-95,6%); FPR 0,13% (95% CI, 0,05-0,26%).

Vari fattori spiegano queste discrepanze, in particolare i mosaicismi feto-placentari, la presenza di un *vanishing twin*, le malattie tumorali materne, i mosaicismi cromosomici materni, l'assenza/insufficienza della FF.

L'analisi del cfDNA può essere effettuata anche sulle gravidanze bigemine, limitatamente allo screening delle principali trisomie autosomiche; il risultato esprime una probabilità distribuita tra i due feti. Il gemello più piccolo, che fornisce una quantità minore di DNA, produce una FF statisticamente inferiore alla media della FF presente nelle gravidanze singole, suggerendo che il contributo al cfDNA della FF da parte delle due placente sia disomogeneo e sia addirittura possibile che una di esse non sia sufficientemente rappresentata ($FF < 4\%$), con il rischio di una percentuale di falsi negativi (FNR). I dati disponibili suggeriscono per la T21, una sensibilità del 95%; per la T18, dell'86%; per la T13, del 100% (i dati numerici delle T13 e T18 sono comunque troppo limitati per raggiungere un valore verosimile di sensibilità), in assenza di FPR per nessuna delle tre trisomie. In presenza di un risultato positivo, il test non indica quale feto sia affetto.

La specificità del NIPT nello screening delle aneuploidie dei cromosomi sessuali è inferiore rispetto a quella degli autosomi. Una metanalisi ha indicato per la monosomia X una sensibilità (DR) del 90,3% (95% CI, 85,7-94,2%) ed una specificità (FPR) dello 0,23% (95% CI, 0,14-0,34%). Per tutte le altre aneuploidie dei

cromosomi sessuali, la sensibilità è risultata del 93,0% (95% CI, 85,8-97,8%) e la specificità dello 0,14% (95% CI, 0,06-0,24%).

Nella prospettiva di sviluppare tecniche in grado di analizzare l'intero genoma, sono stati messi a punto pannelli che analizzano singole microdelezioni associate ad alcune sindromi clinicamente riconoscibili, ma questi test necessitano tutti di essere validati. Analogamente, si stanno mettendo a punto test per lo screening molecolare di malattie mendeliane. I primi screening hanno riguardato la determinazione del sesso del feto, basata sulla ricerca nel plasma materno di sequenze di SRY e DYS14 del cromosoma Y, una tecnica attualmente utilizzata in alcuni Paesi per monitorizzare le gravidanze a rischio per alcune malattie legate al cromosoma X. Altri protocolli riguardano lo screening del fenotipo Rh del feto concepito da madri RhD-negative, dell'acondroplasia originata de novo al concepimento o segregata da un padre affetto, del nanismo tanatoforo, della sindrome di Apert. Analogamente possono essere sottoposte a screening le malattie autosomiche recessive, nelle quali i genitori sono eterozigoti per mutazioni diverse. In questi casi, l'esclusione o la presenza dell'allele paterno possono essere utilizzate per precisare la probabilità che il feto sia affetto, come nel caso della talassemia o della fibrosi cistica. La maggior parte di questi protocolli sono ancora sperimentali.

Le linee-guida del Ministero della Salute hanno formulato una serie di raccomandazioni:

- ✓ Il cfDNA/NIPT è il test di screening prenatale dotato al momento di maggiore sensibilità e specificità per lo screening della trisomia 21.
- ✓ Il cfDNA/NIPT riduce il ricorso alle indagini diagnostiche invasive, che hanno costi più elevati, e, di conseguenza, riduce il rischio di aborto collegato a quelle tecniche.
- ✓ Il cfDNA/NIPT non fornisce un risultato in circa il 2% dei casi, per l'inadeguatezza del campione correlata alla bassa concentrazione del cfDNA nel plasma materno; al momento non sono disponibili studi in grado di chiarire se questi fallimenti si associno alla presenza, nel feto, di altre anomalie cromosomiche al di fuori delle trisomie 13 e 18.

L'utilizzo del cfDNA/NIPT come screening contingente dopo il Test Combinato (eseguito da operatori certificati) appare il modello migliore per la sua implementazione a livello nazionale, in quanto avrebbe un limitato impatto complessivo sulla spesa sanitaria, a differenza dello screening universale, ed appare in grado di superare il problema dei casi senza risultato.

L'estensione del cfDNA/NIPT alle trisomie 18 e 13, utilizzandolo come screening contingente, non aumenterebbe il ricorso alle tecniche invasive, qualora i casi senza risultato fossero gestiti con il Test Combinato.

Il cfDNA/NIPT deve essere offerto nell'ambito di una consulenza con specialisti di genetica medica/medicina fetale, integrata da un esaustivo consenso informato, nel quale deve essere fatto specifico riferimento alla volontà di essere o di non essere informati su eventuali risultati incidentali, clinicamente rilevanti, emersi dall'analisi.

Il cfDNA/NIPT non è sostitutivo e perciò non evita di effettuare le altre indagini cliniche, laboratoristiche e strumentali che fanno parte integrante del monitoraggio della gravidanza.

I Centri che erogano il test devono avere competenze nella diagnosi ecografica e nella diagnosi prenatale; essere in grado di offrire la consulenza prima e dopo il test; devono essere collegati con laboratori certificati, che partecipano a programmi di controllo della qualità, nazionali ed internazionali e sono dotati di personale con competenza specifica nelle tecniche NGS.

Le caratteristiche del test raccomandano che esso venga eseguito presso un numero ristretto di laboratori a livello nazionale; per questo è auspicabile una pianificazione ed un accordo interregionale.

Devono essere predisposte campagne di informazione alla popolazione e di formazione dei professionisti, per garantire equità nell'accesso al test.

4.b.2 La diagnosi prenatale genomica (NGPD - *Next Generation Prenatal Diagnosis*)

Il DNA estratto dalle cellule fetali acquisite mediante amniocentesi o villocentesi, viene di solito esaminato per singoli geni le cui mutazioni sono causa di malattie mendeliane per le quali la coppia è a rischio. I dati raccolti dalla SIGU hanno stimato che il 5-10% di tutte le indagini molecolari effettuate in Italia riguardino la diagnosi prenatale di malattie mendeliane. I test molecolari nel loro complesso sono aumentati negli anni. L'ultima rilevazione, del 2011 ne aveva censiti più di 260.000 (con un incremento del 6% rispetto alla precedente rilevazione del 2007). Queste analisi fanno ovviamente riferimento al gene-malattia indagato (al momento sono note le basi molecolari di circa 4500 malattie mendeliane per le quali sono disponibili specifici test).

Il sequenziamento tradizionale (secondo la metodica di Sanger) è attualmente il *gold standard* per la diagnosi molecolare prenatale delle malattie genetiche a difetto molecolare noto. Le tecnologie NGS hanno rivoluzionato i protocolli diagnostici, rendendo in teoria possibile l'analisi di tutte le malattie mendeliane. Nelle sue applicazioni allo studio del DNA fetale, questa procedura viene definita amniocentesi genomica o diagnosi prenatale con sequenziamento di seconda generazione o NGPD (*Next Generation Prenatal Diagnosis*), impropriamente "super-amniocentesi". Questa analisi consente di effettuare lo screening di circa il 50% delle malattie mendeliane (di molte malattie genetiche non è ancora noto il difetto molecolare; inoltre dallo screening sono escluse le malattie estremamente rare e quelle per le quali non viene ritenuta etica la diagnosi prenatale). La NGPD non analizza i polimorfismi di suscettibilità (SNP), cioè le varianti che predispongono allo sviluppo delle malattie complesse, e neppure le malattie ad esordio tardivo, né le malattie del comportamento né quelle psichiatriche.

Si possono considerare tre principali scenari all'interno dei quali effettuare la diagnosi prenatale molecolare, con tecniche tradizionali e/o NGS.

Il primo, riguarda la diagnosi di una specifica malattia mendeliana per la quale la gravidanza è a rischio; il secondo, l'esclusione di una malattia mendeliana in un feto affetto da difetti eco-evidenziati, in una gravidanza che non presentava un rischio a priori aumentato, in base alla storia familiare; il terzo, lo screening allargato delle mutazioni correlate a molte malattie mendeliane, in una gravidanza che non presenta a priori uno specifico aumento del rischio.

Nel primo caso, è indispensabile identificare nella famiglia o in un probando la mutazione responsabile della malattia per la quale la gravidanza è a rischio. L'approccio più efficace è quello di definire, prima della gravidanza, il difetto molecolare responsabile della malattia. In questo caso, la NGS può eventualmente essere utilizzata per ricercare nella famiglia la mutazione patogenetica, mentre la successiva diagnosi prenatale viene effettuata con un test molecolare tradizionale.

Nel secondo caso, la NGPD può intercettare una malattia mendeliana non sospettata in base alla storia familiare, qualora il feto presenti dei difetti, non interpretabili con le tecniche strumentali e di laboratorio tradizionali. Tuttavia, la *detection rate* in questi casi è molto bassa: in una piccola coorte di feti e neonati con anomalie ecografiche prenatali e cariotipo normale, la NGPD ha identificato varianti patogenetiche nel 10% dei

casi. Sono inoltre noti singoli casi di malattie mendeliane sospettate nel corso della gravidanza, poi risolte con la NGS.

Nel terzo caso, al fine di escludere la presenza di una malattia mendeliana nel feto, la NGPD può trovare applicazione nello screening delle gravidanze senza rischi specifici, utilizzando le cellule fetali acquisite con le tecniche invasive routinarie.

Questo test è oggi disponibile presso alcune strutture private, ma presenta una serie di criticità, ad esempio, l'incapacità di individuare tutte le mutazioni presenti nei geni analizzati, cioè un limite nella sensibilità del test, che dipende essenzialmente dal numero delle volte in cui la stessa sequenza di DNA viene decodificata (cosiddetto *coverage*). Di fatto, non è chiaro in quale misura i geni in esame siano "coperti", il che comporta una percentuale non piccola di risultati falsi negativi. Inoltre, la capacità di questi test di individuare le malattie genetiche nel feto è di solito sovrastimata. Infatti, il test individua le mutazioni presenti in un numero limitato di geni-malattia, di solito quelli responsabili delle malattie più comuni, mentre le malattie genetiche a difetto molecolare noto sono ben più numerose. Inoltre, il test non riconosce alcuni tipi di errore presenti nel DNA (ad esempio le mutazioni da espansione del DNA, le inserzioni e le delezioni). A tutto ciò va aggiunto che le analisi genomiche identificano migliaia di variazioni nella sequenza del DNA, molte delle quali prive di significato patologico e molte di interpretazione non univoca. Perciò, questo test necessita di essere preceduto e seguito da una complessa consulenza genetica.

In conclusione, l'uso di questi test non ha al momento sufficienti supporti scientifici per giustificarne l'applicazione nella diagnosi prenatale. A fronte della strabordante pubblicità ingannevole del settore, è indispensabile che le donne che intendono sottoporsi a questo test ricevano informazioni complete e veritiere da un genetista medico.

Obiettivi e Raccomandazioni

Da quanto esposto emergono le seguenti priorità, rispetto alle quali sono identificabili i relativi interventi (Tabella 6):

- **Promuovere la diffusione della diagnosi prenatale non invasiva sul DNA fetale presente nel circolo materno.** Relativamente all'uso del test cfDNA/NIPT per lo screening della trisomia 21, il CSS ha già prodotto la relativa LG. È tuttavia da garantire l'accesso a tutta la popolazione target; pertanto permane l'esigenza di promuovere/monitorare la diffusione dei Percorsi di presa in carico (PDTA) e la consapevolezza nella popolazione in tutto il personale sanitario teoricamente coinvolto (*Literacy*).
 - Organizzazione di un percorso. Assunto che la linea-guida riguarda per definizione la dimensione tecnico-professionale; le raccomandazioni derivate dalla LG devono portare alla implementazione di un'organizzazione in grado di accogliere la popolazione target in un percorso esplicito, basato su 'nodi organizzativi' chiaramente definiti e procedure di 'ingaggio' precise ed esplicite. Si tratta quindi di definire un PDTA che prenda in carico gli individui destinatari dello screening.
 - Campagne di informazione: Come espresso nel Capitolo 7, nella attuale fase di sviluppo dell'uso delle scienze omiche, si tratta prioritariamente di sviluppare una vera e propria *literacy* sia del personale non specializzato del servizio sanitario nazionale sia della popolazione piuttosto che programmare direttamente l'uso dei media. Pertanto le esigenze

divulgative ed informative sull'uso appropriato dei test prenatali di carattere genomico vanno perseguite con le strategie e metodologie previste nel cap 7.

- **Definire percorsi per diagnosi prenatale genomica (NGPD - *Next Generation Prenatal Diagnosis*).** La disponibilità di sufficienti evidenze scientifiche mette il Sistema Sanitario in condizione di inserire tale valutazione in modo sistematico nell'ambito dei servizi offerti alla popolazione di riferimento (secondo le modalità identificate dalle Linee-guida: v. dopo). Si identifica quindi un intervento di sanità pubblica con le seguenti caratteristiche: basato su valutazioni di efficacia sperimentale; organizzato per profili di assistenza e quindi non soltanto delegato alla competenza /sensibilità/ iniziativa tecnico-professionale; mirato all'equità e quindi basato sul coinvolgimento attivo della popolazione destinataria; dotato di un esplicito sistema informativo e di valutazione. Il processo di trasferimento delle nuove conoscenze scientifiche nella pratica, impone la sua articolazione nei seguenti step:
 - Produrre line-guida per la definizione di percorsi per diagnosi prenatale genomica (NGPD - *Next Generation Prenatal Diagnosis*). Tale obiettivo può essere conseguito in armonia con il Sistema nazionale linee guida (SNLG) che è impostato per elaborare raccomandazioni di comportamento clinico basate sugli studi scientifici più aggiornati, secondo il proprio metodo; è riconducibile a tale processo anche la collaborazione con società scientifiche ed esperti di settore. In tale *framework* di livello nazionale potrà essere prodotta una linea-guida per l'uso appropriato della diagnosi prenatale genomica (*NGPD - Next Generation Prenatal Diagnosis*). La successiva fase di implementazione è riconducibile alle responsabilità e metodi della programmazione e management dei servizi sanitari regionali e richiede un processo esplicito di recepimento e applicazione .
 - Organizzazione di un percorso. Assunto che la linea-guida riguarda per definizione la dimensione tecnico-professionale; le raccomandazioni derivate dalla LG devono portare alla implementazione di un'organizzazione in grado di accogliere la popolazione target in un percorso esplicito, basato su 'nodi organizzativi' chiaramente definiti e procedure di 'ingaggio' precise ed esplicite. Si tratta quindi di definire un PDTA che prenda in carico gli individui destinatari dello screening.
- **Campagne di informazione:** Come espresso nel Capitolo 7, nella attuale fase di sviluppo dell'uso delle scienze omiche, si tratta prioritariamente di sviluppare una vera e propria *literacy* sia del personale non specializzato del servizio sanitario nazionale sia della popolazione piuttosto che programmare direttamente l'uso dei media. Pertanto le esigenze divulgative ed informative sull'uso appropriato dei test prenatali di carattere genomico vanno perseguite con le strategie e metodologie previste nel cap 7.

Tabella 6. Interventi identificabili

Argomento: <i>test prenatali</i>

	Responsabilità operativa	Indicatori per la valutazione di processo
Intervento 1: <i>promuovere la diffusione della diagnosi prenatale non invasiva sul DNA fetale presente nel circolo materno</i>		
Azioni		
<ul style="list-style-type: none"> Definire PDTA 	intervento 'Regionale'	Definizione del PDTA da parte della Regione: indicatore dicotomico S/N
		Casi trattati all'interno del PDTA: indicatore quantitativo Percentuale sul totale delle prestazioni eseguite in ambito strutture pubbliche/accreditate
Intervento 2: <i>definizione di percorsi per diagnosi prenatale genomica (NGPD - Next Generation Prenatal Diagnosis)</i>		
Azioni .		
<ul style="list-style-type: none"> Definire linee-guida 	intervento 'Centrale'	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> Implementare linee-guida 	intervento 'Regionale'	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> Definire PDTA 	intervento 'Regionale'	Definizione del PDTA da parte della Regione: indicatore dicotomico S/N
		Casi trattati all'interno del PDTA: indicatore quantitativo

		Percentuale sul totale delle prestazioni eseguite in ambito strutture pubbliche/accreditate
--	--	---

4.c Screening neonatale ed approcci genomici

- Introduzione.* Lo screening neonatale ha lo scopo di individuare i neonati affetti da malattie congenite genetiche del metabolismo ed avviare il più precocemente possibile un trattamento in grado di impedire lo sviluppo e la progressione della malattia. In Italia dal 1999 tutti i neonati sono sottoposti a screening neonatale per ipotiroidismo congenito, fibrosi cistica, fenilchetonuria. Ulteriori malattie oggetto di screening introdotte successivamente sono il deficit di biotinidasi, la galattosemia, l'iperplasia surrenale congenita. Alcune Regioni hanno promosso uno screening allargato a più di 40 malattie metaboliche, indicazione recepita anche dalle recenti proposte dei LEA.

Attualmente la "Spettrometria di massa tandem" (MS/MS) spettrometria di massa è la tecnica utilizzata per l'analisi di screening delle malattie metaboliche ereditarie e si basa sul dosaggio dell'attività enzimatica e/o l'identificazione di metaboliti su spot di sangue essiccato. Come tutti i test di screening, l'analisi biochimica ha un'elevata sensibilità che riduce al minimo i "falsi negativi", a scapito di una specificità più bassa con un numero relativamente elevato di "falsi positivi".

L'analisi genetica nello screening neonatale è al momento considerata un esame di II livello, riservato a quei campioni risultati positivi al test biochimico (I livello), al fine di ridurre il numero di "falsi positivi". Il suo ruolo è determinato dalle caratteristiche intrinseche delle tecnologie utilizzate, quali la quantità di DNA necessaria, il costo elevato, i tempi di refertazione e i limiti tecnici di analisi.
- Introduzione di approcci genomici nello Screening neonatale.* Le tecnologie NGS consentono di rivalutare l'uso dell'analisi genetica nell'ambito dello screening neonatale, come potenziale test di I livello in sostituzione dell'analisi biochimica. I vantaggi che ne deriverebbero comprendono la possibilità di aumentare lo spettro delle mutazioni indagabile e l'estensione dell'analisi anche ai geni responsabili di patologie non metaboliche, comunque trattabili.

Alcuni aspetti renderebbero però problematico l'uso delle tecniche NGS nello screening neonatale. Tra essi, i limiti tecnici dell'analisi (*coverage*, riproducibilità, quantità di DNA necessaria e tipo di campione), l'interpretazione delle varianti di significato incerto e la loro rivalutazione a distanza di tempo, la refertazione di dati non propriamente relativi a malattie metaboliche soggette a screening (ad es. quelli relativi alle malattie ad insorgenza nell'età adulta, la suscettibilità allo sviluppo di neoplasie, i dati di farmacogenetica, ecc).

Per tentare di valutare l'efficacia e la riproducibilità delle tecniche NGS nello screening neonatale, sono stati condotti alcuni studi, che hanno utilizzato piccole quantità di DNA estratto da spot di sangue essiccato su cartine di Guthrie mediante *targeted resequencing*, *whole genome sequencing* (WGS) e *whole exome sequencing* (WES), con risultati pressoché sovrapponibili a dimostrazione di una elevata concordanza e riproducibilità dei risultati.

Altri studi hanno effettuato in parallelo lo screening neonatale biochimico e l'analisi con tecniche NGS

per confrontarne i risultati. In uno studio di *Bodian et al.* sono stati analizzati i campioni di 1696 neonati di diversa origine geografica, sia sani che affetti o prematuri, ed è stata ottenuta una buona concordanza tra i risultati biochimici e quelli genetici in 1183 campioni, con una discordanza in 513 casi, comprendenti tra l'altro varianti di significato incerto (80%), falsi positivi all'analisi biochimica (16%), falsi positivi all'analisi genetica (3%), falsi negativi all'analisi genomica (1%).

- *Aspetti etici e legali.* Lo screening neonatale biochimico viene attualmente eseguito senza richiesta del consenso dei genitori nell'ambito degli screening obbligatori. L'introduzione dell'NGS nello screening neonatale comporterebbe l'acquisizione del consenso dopo aver adeguatamente informato le famiglie riguardo al tipo di analisi, ai possibili risultati, soprattutto per l'analisi di genoma o esoma. I genitori avrebbero la possibilità di scegliere se fare sottoporre i propri figli al test, con la conseguenza che non tutti i neonati potrebbero essere sottoposti a screening. I genitori dovrebbero inoltre decidere se ricevere i risultati relativi alle patologie metaboliche dello screening e sugli eventuali "*incidental findings*" riguardanti malattie ad insorgenza in età adulta. Su questo punto le attuali linee guida sconsigliano l'analisi di WGS e WES in soggetti sani, soprattutto in minorenni: questa raccomandazione si basa sulla tutela del diritto di scelta del singolo individuo di essere informato riguardo ai propri dati genetici e il consenso può essere espresso solo al raggiungimento della maggiore età in caso di dati relativi a patologie di "rilevanza non immediata".
- *La propensione dei genitori.* Alcuni studi si sono proposti di indagare l'interesse dei genitori in relazione alla possibilità di sottoporre i propri figli al sequenziamento del genoma. Waisbren et al. hanno sottoposto un questionario a 663 genitori, subito dopo la nascita del loro figlio e qualche mese dopo. Dai risultati è emerso che la scelta dei genitori è influenzata in parte dallo stress del periodo neonatale, e ci sono stati più genitori favorevoli all'analisi WGS tra i casi in cui lo screening biochimico aveva fornito un risultato patologico. Questi dati sono stati confermati da un altro studio di Frankel et al., in cui è stato anche osservato che il riscontro di mutazioni o varianti comporta un senso di colpa nei genitori tale da incrementare lo stress e l'ansia del periodo neonatale. Secondo Waisbren et al, la proposta dell'analisi WGS dopo qualche mese dal parto ha avuto meno consensi rispetto alla proposta alla nascita, per cui è stato concluso che le tempistiche del test influenzano il parere delle famiglie, probabilmente in relazione allo stress del periodo neonatale. Joseph e al. hanno proposto di estendere l'analisi WGS ai genitori di bambini affetti da deficit immunitario congenito, dopo l'acquisizione del consenso informato ed un colloquio con le famiglie. Nonostante la differenza dei livelli culturali e socioeconomici, tutti i genitori erano favorevoli a ricevere i risultati dell'analisi WGS relativi allo screening neonatale, ma non tutti concordavano sulle informazioni riguardanti le malattie a esordio nella vita adulta e sui dati di farmacogenetica.

Obiettivi e Raccomandazioni

Da quanto esposto emergono le seguenti priorità, rispetto alle quali sono identificabili i relativi interventi (Tabella 7):

- **Definire i percorsi di presa in carico.** Considerata l'evoluzione della conoscenza scientifica e del quadro legislativo, emerge la priorità di garantire l'organizzazione della presa in carico per assicurare

qualità ed equità di accesso.

Raccomandazioni.

Finora è stata dimostrata l'efficacia e la riproducibilità dell'analisi NGS, anche su campioni utilizzati di routine nello screening neonatale, caratteristiche tecniche che consentono la potenziale introduzione di approcci genomici come indagini per lo screening neonatale. Tuttavia, l'interpretazione delle varianti di significato incerto e le tempistiche di refertazione delle analisi di migliaia di campioni, lo stoccaggio dei numerosi dati, rendono poco realistico al momento il loro impiego come analisi di I livello.

Pertanto attualmente si raccomanda che tecniche di analisi NGS siano eseguite solo in seconda istanza, successivamente allo screening biochimico positivo, per ridurre il numero di falsi positivi, risolvere diagnosi dubbie, distinguere mutazioni causative di condizioni non identificabili con lo screening biochimico.

A questo proposito la Società Europea di Genetica Umana (ESHG <https://www.eshg.org/home.0.html>) consiglia di ricorrere al *target sequencing* in ambito di screening neonatale, per focalizzare l'analisi solo alle condizioni genetiche di patologie metaboliche per le quali è possibile un trattamento efficace.

Infine, l'introduzione dell'analisi genetica nello screening implica una riflessione su alcune tematiche, principalmente etiche, sulla possibilità di sottoporre un neonato apparentemente sano, che non ha manifestato ancora sintomi o segni di alcuna patologia, ad analisi WGS e WES, con conseguente consenso dei genitori all'informazione dei dati genetici.

Tabella 7. Interventi identificabili

Argomento: <i>malattie genetiche congenite</i>		
	Responsabilità operativa	Indicatori per la valutazione di processo
Intervento 1: <i>presa in carico dei neonati positivi allo screening neonatale delle malattie metaboliche ereditarie</i>		
Azioni .		
<ul style="list-style-type: none">Progressivo utilizzo delle tecnologie di NGS nei test di conferma diagnostica (II livello)	intervento 'Regionale'	Percentuale di centri di conferma diagnostica che utilizzano tecnologie NGS
<ul style="list-style-type: none">Definizione di linee-guida per la presa in carico dei pazienti positivi alla conferma diagnostica, complete dei requisiti standard dei Centri Clinici per il follow up	intervento 'Centrale'	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none">Definire percorso clinico di presa in carico (PDTA)	intervento 'Regionale'	Definizione del PDTA da parte della Regione: indicatore dicotomico S/N

		Casi trattati all'interno del PDTA: indicatore quantitativo Percentuale sul totale delle prestazioni eseguite in ambito strutture pubbliche/accreditate
--	--	--

4.d Test post-natali

4.d.1 Malattie Mendeliane

La possibilità di analizzare l'intera sequenza del genoma con le nuove tecniche di sequenziamento di seconda generazione ha trovato un'estesa applicazione nel riconoscimento delle mutazioni responsabili di malattie ereditarie. L'approccio genomico ha rivoluzionato lo studio di queste malattie, supera spesso l'analisi del singolo gene (o di una sua porzione) considerato responsabile, quando mutato, della malattia, ma utilizza l'analisi dell'intera sequenza del DNA genomico, o della porzione codificante (esoma), o di un pannello allargato di geni potenzialmente coinvolti nella malattia (*targeting resequencing*). Il capitolo 3a ha già discusso l'approccio genomico nella diagnosi delle malattie Mendeliane. In questa sezione del documento vengono sviluppati alcuni concetti in relazione all'impiego dell'indagine genomica nella prevenzione personalizzata di queste malattie.

I test genetici

La ricerca genetica applicata all'uomo ha prodotto negli ultimi 30 anni un risultato traslazionale principale, ovvero il trasferimento delle conoscenze nella pratica clinica, con lo sviluppo dei test genetici. Secondo una definizione accreditata, "i test genetici consistono nell'analisi di un gene, del suo prodotto o della sua funzione, dei cromosomi o di altro DNA, per identificare o escludere una modificazione che può associarsi ad una malattia genetica" (Harper, 1997).

Tuttavia, dato che i test genetici non analizzano necessariamente solo le condizioni patologiche, l'autorevole *Human Genetic Commission* britannica (2009) ha ridefinito i test genetici indicandoli come "le analisi rivolte ad individuare la presenza, l'assenza o la mutazione di un particolare gene, di un cromosoma, di un prodotto di un gene o di un metabolita, che sono indicative di una specifica modificazione genetica".

Questa definizione viene correntemente utilizzata come il contenitore di alcune indagini di largo impatto, soprattutto, ma non esclusivamente, nella professione medica. Esse comprendono, secondo la modalità ricercata: i test diagnostici, i test presintomatici, i test per l'identificazione dei portatori sani, i test di farmaco genetica, i test predittivi o di suscettibilità, i test comportamentali e di orientamento sugli stili di vita, i test di nutri genetica, i test fenotipici, i test rivolti a definire i rapporti di parentela, i test ancestrali, i test di compatibilità genetica.

I *test diagnostici* si applicano alle persone affette da qualche patologia, spesso trasmessa con il modello

dell'eredità semplice o mendeliana (ad es. distrofia muscolare di Duchenne, da mutazione del gene *DMD*), oppure a dismorfismi causati da una patologia cromosomica (ad es. sindrome di Down da trisomia 21) o genomica (ad es. sindrome di Williams, da microdelezione 7q11.23), e vengono utilizzati per confermare un sospetto clinico o per aiutare il clinico in una diagnosi, per sottoclassificare una malattia, per stabilire correlazioni genotipo-fenotipo (cioè tra la costituzione genetica e l'insieme delle caratteristiche morfologiche e funzionali), e perciò definire la storia naturale della malattia. In generale, per migliorare la consulenza genetica e, occasionalmente, per orientare la terapia.

I *test presintomatici* si eseguono sulle persone non affette, che appartengono alle famiglie nelle quali una malattia, ad esordio tardivo, si trasmette in maniera autosomica dominante (ad es. corea di Huntington, rene policistico tipo adulto, atassie spino-cerebellari, distrofia miotonica, ecc.). L'identificazione di una mutazione nel gene-malattia stabilisce che quella persona, se vivrà sufficientemente a lungo, svilupperà la malattia.

I *test per l'identificazione dei portatori sani* riguardano in teoria tutta la popolazione, in quanto, per definizione, ogni persona è eterozigote (portatore sano) per un piccolo numero di geni che, se mutati, possono causare delle malattie e che possono essere trasmessi da una generazione all'altra. Nel caso di pazienti affetti da malattie recessive (sia autosomiche sia legate all'X), il test genetico è indicato per i familiari in età riproduttiva, per definire il rischio di ricorrenza collegato alla condizione di portatore sano. Nel caso specifico delle malattie autosomiche recessive, può essere orientativamente indicata la frequenza di 1:10.000 nella popolazione degli omozigoti affetti da tale condizione, per indicare la soglia, al di sotto della quale i familiari potenzialmente a rischio di essere portatori dovrebbero essere testati. Di fatto, per una frequenza di 1:10.000 omozigoti affetti è attesa una frequenza di eterozigoti di 1:50. In questo caso un fratello/sorella di un affetto ha 2/3 di probabilità di essere eterozigote e, considerata la frequenza di 1:50 eterozigoti attesa nella popolazione, il loro rischio riproduttivo sale da 1:10.000 (frequenza di quella malattia nella popolazione) a 1:300.

I *test di farmacogenetica* predicono la risposta individuale ai farmaci, in termini di efficacia e di rischio relativo di eventi avversi (ad es. il gene della tiopurina metiltransferasi definisce la risposta alla 6-mercaptopurina, un farmaco utilizzato nel trattamento delle leucemie).

I *test predittivi o di suscettibilità* valutano, nella persona che si sottopone al test, la presenza di una suscettibilità o di una resistenza nei confronti di una malattia complessa e comune (cosiddette "malattie multifattoriali" che originano dall'interazione tra i geni e l'ambiente), diversa da quella media della popolazione (ad es. suscettibilità alla celiachia, al diabete tipo 2; alla malattia di Crohn).

I *test comportamentali e di orientamento sugli stili di vita* forniscono informazioni sulle tendenze comportamentali individuali, sulle capacità fisiche e cognitive, sulla risposta a certe condizioni ambientali. Hanno lo scopo di aiutare la persona a modificarne le conseguenze potenzialmente negative di tali comportamenti, attraverso cambiamenti elettivi (ad es. analisi dell'HLA per definire la sensibilità al berillio, un metallo utilizzato in vari tipi di lavorazione industriale).

I *test di nutrigenetica* forniscono informazioni sulle modalità con le quali una persona metabolizza i cibi (ad es. geni coinvolti nel metabolismo dei lipidi, degli acidi grassi, degli zuccheri, degli aminoacidi).

I *test fenotipici* identificano le modalità con le quali il genotipo condiziona il fenotipo (ad es. correlazione tra certe mutazioni alleliche del gene *LAMNA/C* e quadri clinici nosologicamente distinti).

I *test per la definizione dei rapporti di parentela* definiscono la percentuale di geni condivisi dalle persone potenzialmente correlate a livello genetico (ad es. paternità e maternità biologica).

I *test ancestrali* stabiliscono i rapporti di una persona nei confronti di un antenato o di una determinata popolazione e quanto del suo genoma sia stato ereditato dagli antenati appartenenti ad una particolare area geografica o gruppo etnico.

I *test di identificazione genetica* determinano la probabilità con la quale un campione o una traccia di DNA recuperato da un oggetto o da altro materiale appartenga ad una determinata persona.

L'approccio finora utilizzato prevede l'analisi di singole sequenze di DNA, in relazione al problema che si intende indagare. E' evidente che con uno studio genomico si raccolgono tutte le informazioni relative al genotipo di una persona, che di fatto comprendono tutte le tipologie dei test genetici sopra riportati. Perciò in teoria fornisce informazioni sulle mutazioni responsabili di malattie mendeliane, permette di riconoscere i geni-malattia per i quali l'individuo è portatore sano, fornisce informazioni sulle reazioni ai farmaci, sulle abitudini alimentari, sui tratti somatici e comportamentali, sulle malattie complesse per le quali è a rischio o nei confronti delle quali è protetto, e può predire le condizioni di rischio nei confronti di malattie monogeniche ad insorgenza nell'età adulta e/o a penetranza incompleta. Ad esempio, la mutazione del gene *BRCA1* ha una probabilità di circa il 70 ed il 40% rispettivamente di esprimersi come tumore della mammella o come carcinoma dell'ovaio nell'arco della vita di una donna eterozigote. Questa caratteristica fa assimilare questo test alla categoria dei predittivi, in quanto è in grado di identificare una suscettibilità diversa da quella media della popolazione. Tuttavia si tende ad utilizzare la definizione di predittivo solo per i test che identificano la componente genetica delle malattie multifattoriali, quelle dovute all'interazione tra l'effetto additivo di più geni e l'ambiente. Analogamente, i test comportamentali e di orientamento sugli stili di vita e i test di nutrigenetica sono, di fatto, test predittivi o di suscettibilità (in quanto si applicano a caratteri complessi), mentre quelli fenotipici possono essere considerati test diagnostici (in quanto si applicano a caratteri semplici).

Il sequenziamento del genoma umano e l'impressionante sviluppo tecnologico, consentono dunque di analizzare in tempi rapidi e a costi relativamente contenuti l'intero genoma, promettono di rendere disponibile su larga scala la decodificazione del profilo genomico individuale e, in teoria, di identificare le variazioni costituzionali che ci rendono suscettibili alle malattie e che influenzano i nostri stili di vita.

I test di suscettibilità e predittivi nel mercato della salute: la categoria dei "non-pazienti"

Il bioeticista George Annas (2000) aveva immaginato che la decodificazione del genoma umano avrebbe identificato nella molecola del DNA una sorta di cartella clinica. Aveva anche anticipato che, prima di raggiungere quell'obiettivo, sarebbe stato necessario rispondere ad alcune domande fondamentali, fra le quali: chi è autorizzato a creare il 'CD' che contiene l'informazione genetica? Chi lo conserva? Chi ne controlla l'uso? In che maniera il 'CD' potrebbe essere trattato come un'informazione medica sensibile? A distanza di oltre tre lustri da quella previsione, lo scenario anticipato sembra a portata di mano. Non solo l'obiettivo di abbattere i costi del sequenziamento del genoma umano e perciò di renderlo disponibile è stato raggiunto ma, soprattutto,

le tecniche in grado di processare su larga scala i campioni biologici sono disponibili presso molti laboratori e i cittadini sono oggetto di crescenti pressioni da parte del mercato della salute, che enfatizza le presunte potenzialità predittive e preventive di queste analisi.

Il sequenziamento del genoma di alcune persone celebri, come i genetisti James Watson (uno degli scopritori della doppia elica del DNA) e Craig Venter (uno dei due coordinatori dei progetti che hanno sequenziato il genoma umano), ha dato il via all'era della "medicina personalizzata" e ha creato nell'opinione pubblica enormi aspettative. Una piccola frazione della sequenza di Watson non è stata resa pubblica, mentre quella di Venter è stata pubblicata nella sua interezza, per quanto riguarda i suoi 23.224 geni e le regioni variabili, compresi alcuni polimorfismi che lo renderebbero potenzialmente suscettibile al comportamento antisociale, all'alcolismo, alla coronaropatia, all'ipertensione, all'obesità, all'insulino-resistenza, all'ipertrofia del cuore sinistro, all'infarto acuto del miocardio, al deficit di lipasi lipoproteica, all'ipertrigliceridemia, all'ictus, alla malattia di Alzheimer.

Craig Venter non è tuttavia una persona particolarmente sfortunata. La sua sequenza genomica esemplifica, di fatto, il "genoma imperfetto" condiviso da ogni persona, per la sola ragione di appartenere alla specie umana. E' infatti noto che ogni persona, presa a caso, è eterozigote per un numero significativo di mutazioni (il 44% dei geni di Venter era eterozigote per una o più varianti). Un piccolo numero di queste mutazioni riguarda i geni responsabili di malattie rare (per lo più trasmesse in maniera mendeliana), mentre alcune migliaia di varianti interessano geni correlati alle malattie complesse, sul cui fenotipo agiscono con un piccolo effetto additivo, che si somma alla componente ambientale (eredità multifattoriale).

Il concetto di eredità multifattoriale è anche suffragato dal sequenziamento del primo uomo di provenienza Asiatica, nel quale è stata dimostrata la presenza di oltre il 56% dei polimorfismi noti che conferiscono suscettibilità alla malattia di Alzheimer, del 15% di quelli per il diabete, del 10% di quelli per l'ipertensione, del 9% di quelli per la malattia di Parkinson e del 63% di quelli della dipendenza dal tabacco.

Lo scenario evidenziato dal sequenziamento di questi primi genomi e confermato dal sequenziamento successivo di centinaia di migliaia di genomi e il potenziale impatto della "predizione genetica", basata sul sequenziamento del genoma delle persone, sulla concezione della salute era stato delineato una decina di anni prima da Jonsen et al. (1996), che avevano anticipato l'incombente presenza, sulla scena della medicina, dei "non-pazienti". Già allora era apparso chiaro che l'imminente possibilità di analizzare la suscettibilità alle malattie comuni avrebbe avvicinato al mondo della medicina milioni di persone asintomatiche. Secondo gli autori dell'articolo, gli *unpatients* sono una nuova classe di persone all'interno della medicina: non sono "pazienti" nel senso classico, in quanto non presentano sintomi; sono persone che condividono predisposizioni genetiche, che potrebbero vivere nell'attesa dell'ipotetica comparsa di qualche segno di malattia, organizzano la loro vita in funzione delle visite mediche o delle analisi di laboratorio, finiscono per sentirsi ammalati o addirittura sviluppano sintomi psicosomatici.

Senza negare l'importanza del profilo genomico e le sue capacità di condizionare in prospettiva la qualità della vita, non si può non ripetere che il nostro stato di salute/malattia non viene definito solo dal DNA ma anche dalla sua interazione con l'ambiente. E' esemplificativo il caso dei gemelli identici (monozigoti) che, pur condividendo lo stesso DNA, nel corso della vita amplificano le loro divergenze fenotipiche, in quanto la complessa regolazione del genoma, che è fortemente condizionata dall'ambiente, crea, di fatto, differenze a livello della funzione dei rispettivi genomi.

Proprio sulla base di queste considerazioni, l'epigenetica ha assunto negli ultimi anni un crescente sviluppo, avendo l'obiettivo di analizzare gli aspetti funzionali del genoma, in particolare i processi biochimici che non modificano la sequenza del DNA, ma che possano modificare il fenotipo attraverso modificazioni funzionali.

Il Catalogo delle Malattie Mendeliane

Il numero complessivo dei fenotipi con accertata o sospetta base mendeliana superava gli 8000 nel mese di novembre del 2016. Erano note le basi genetiche di circa i 2/3 dei tali fenotipi (<http://www.omim.org/statistics/entry>). Questo gap conoscitivo potrà essere colmata dalle tecniche di sequenziamento di seconda generazione. In parallelo sta aumentando il numero dei fenotipi nosologicamente distinti, come conseguenza del miglioramento delle capacità di caratterizzare i fenotipi, alla condivisione delle terminologie cliniche e delle infrastrutture sulle quali mettere in comune le casistiche delle malattie rare (Centers for Mendelian Genomics supportati da NHGRI e NHLBI negli USA, FORGE Canada, e WTDDD nel Regno Unito). L'aumento del numero dei fenotipi non è peraltro inatteso, se si considera che il genoma umano contiene oltre 20.000 geni codificanti proteine, la maggior parte dei quali si è altamente conservata nell'evoluzione. E' perciò verosimile che anche la maggior parte delle mutazioni in questi geni comportino conseguenze fenotipiche. Si deve inoltre considerare che le alleliche (mutazioni diverse dello stesso gene) possono associarsi a fenotipi diversi.

La maggior parte delle malattie sono al momento riconducibili alla parte codificante del genoma, ma sta emergendo un nuovo paradigma. Un gene è un tratto di DNA che viene trascritto, anche se non viene tradotto; è probabile che quest'altro catalogo di geni (non codificanti ma utilizzati comunque dal nostro organismo) siano almeno numerosi quanto quelli codificanti. Stanno di fatto emergendo malattie monogeniche dovute a mutazioni di sequenze non codificanti per proteine, ma che codificano per RNA. Il catalogo dei geni è quindi destinato ad aumentare, così come il catalogo delle malattie dovute a mutazioni di sequenze del DNA.

La prevenzione delle malattie mendeliane

I risultati della ricerca e le crescenti potenzialità diagnostiche conseguenti all'introduzione nella pratica clinica delle tecniche di sequenziamento di seconda generazione hanno avuto ripercussioni anche sul fronte della prevenzione delle patologie mendeliane ad esordio nella vita post-natale (ad esempio diverse patologie neoplastiche, miocardiopatie e cardiopatie aritmogene, diabete mellito tipo MODY). La maggior parte di queste condizioni mostra un elevato grado di eterogeneità genetica e pertanto l'approccio NGS è particolarmente indicato nella individuazione delle varianti genetiche causative. Queste tecniche, in particolare l'analisi di pannelli di geni candidati mediante *targeted resequencing*, vengono sempre più utilizzate nella prevenzione oncologica e cardiologica. In questo modo è stato possibile ottenere un miglioramento della resa diagnostica, con l'identificazione mediante WES di nuovi geni-malattia, anche se sono aumentati contestualmente i risultati di difficile interpretazione, in particolare i cosiddetti VOUS e gli *incidental findings*.

Trattandosi di condizioni non frequenti (nel caso di malattie comuni, come i tumori, le forme su base mendeliana, rappresentano circa il 5-10% del totale dei casi), l'approccio standard alla prevenzione delle malattie mendeliane in epoca post-natale prevede l'individuazione dei soggetti a rischio attraverso l'analisi dell'albero genealogico ed il fenotipo clinico (ad es. aggregazione familiare di specifiche patologie, insorgenza in età precoce rispetto alla media della popolazione generale, e/o altre caratteristiche cliniche specifiche). Un risultato negativo di un test di predisposizione, eseguito con metodiche tradizionali o analizzando un pannello di geni, non consente di escludere la presenza di una variante genetica causativa non rilevata; ciò può essere dovuto al fatto che non sono stati analizzati tutti i geni noti già correlati con il fenotipo di interesse, oppure al coinvolgimento di altri meccanismi genetici non ancora individuati. Inoltre, è noto che l'approccio clinico basato

sull'analisi del fenotipo e sull'impiego dei test convenzionali comporta ritardi ed errori diagnostici, anche di fronte a patologie per le quali i test sono ampiamente disponibili e validati, come la fibrosi cistica e la sindrome dell'X fragile. Un approccio su scala più larga (WES o WGS) dovrebbe quindi consentire di ridurre il numero di risultati non informativi. In effetti, gli approcci genomici hanno consentito di individuare nuovi geni responsabili di patologie mendeliane potenzialmente prevenibili mediante implementazione di specifiche misure cliniche.

Il sequenziamento genomico preventivo

Il miglioramento delle conoscenze sulle basi genomiche di diverse patologie, insieme alla riduzione dei costi delle tecnologie di sequenziamento di seconda generazione, ha dato origine al concetto di sequenziamento genomico preventivo (*Preventive Genomic Sequencing*, PGS), un termine con il quale si indica l'obiettivo di identificare i portatori silenti di varianti che determinano un'elevata predisposizione allo sviluppo di malattie mendeliane, in particolare quelle per le quali sono disponibili approcci preventivi validati. A differenza dei programmi di screening genetico tradizionali, il PGS non sarebbe quindi limitato alle persone/famiglie riconosciute ad alto rischio, ma sarebbe applicabile all'intera popolazione per individuare casi latenti o non ancora individuati di patologie genetiche.

La possibile implementazione del PGS comporta diverse problematiche, di natura etica, legale e clinica. Limitandosi a considerare quest'ultimo aspetto, il problema centrale è rappresentato dalla scelta delle patologie che si vorrebbero testare. In ambito diagnostico e di ricerca è stato già proposto di limitare la comunicazione dei risultati incidentali alle varianti genetiche responsabili di patologie per le quali siano disponibili interventi clinici di provata efficacia (*medically actionable genes*, MAGs), lasciando ai pazienti la scelta se essere informati e, in caso affermativo, in maniera completa o parziale, dei risultati emersi dall'indagine.

Al momento è stato proposto che gli eventuali programmi di PGS, essendo di natura pilota, siano focalizzati sui MAGs. Un aspetto importante da chiarire riguarda il grado di informazioni da comunicare preliminarmente alle persone che richiedono il test e la possibilità di decidere se ricevere o meno i risultati inerenti a specifici geni o malattie. Se la finalità del PGS fosse la riduzione della frequenza globale delle patologie causate dalle varianti nei geni indagati, il programma dovrebbe essere applicato a tutta la popolazione. Ammesso che tutti i soggetti potenzialmente interessati potessero accedere al test, l'impatto, in termini di salute pubblica, non sarebbe tuttavia molto significativo. Si stima infatti un tasso di risultati positivi dello 0,5-1%. Per alcune patologie, ciò comporterebbe la possibilità di implementare programmi di prevenzione, ma l'incidenza globale della malattia non sarebbe sostanzialmente ridotta. Ad esempio, i geni *BRCA1* e *BRCA2* causano circa il 5-10% dei tumori del seno e il 15% dei carcinomi ovarici, e i geni del *mismatch repair*, associati alla sindrome di Lynch, sono implicati nell'1-3% dei carcinomi coloretali e nell'1% circa dei carcinomi dell'endometrio. La maggior parte di questi tumori non sarebbe quindi prevenibile attraverso l'implementazione di programmi PGS, e il beneficio, a livello della popolazione generale, sarebbe limitato. Inoltre, il rischio conferito da una variante patogenetica riscontrata in un soggetto che non ha storia familiare o personale della malattia alla quale la variante è associata potrebbe essere sostanzialmente diverso da quello che ha una persona affetta e/o con storia familiare positiva per la malattia, a causa dell'intervento di fattori modificatori ancora largamente sconosciuti. I database genetici contenenti i risultati delle analisi WES effettuate con finalità di ricerca (*ExAC*, *Exome Aggregation Consortium*; <http://exac.broadinstitute.org/>) hanno messo in evidenza una frequenza relativamente elevata di varianti associate a patologie mendeliane considerate patogenetiche, sollevando dubbi sul loro effettivo significato clinico.

In conclusione, i test genomici post-natali per la prevenzione delle malattie mendeliane trovano oggi indicazione per l'analisi di pannelli di geni mediante *targeted resequencing* o in silico dopo sequenziamento dell'intero esoma. Può essere preso in considerazione l'esoma quando la causa genetica di un fenotipo con caratteristiche che suggeriscono una base mendeliana non è stata identificata in base all'analisi dei geni candidati noti. L'offerta e l'implementazione di programmi di PGS richiede invece ulteriori discussioni ed eventuali studi pilota per verificarne l'utilità clinica e chiarirne le problematiche etiche connesse.

A titolo di esempio, negli approfondimenti viene riportato l'approccio genomico alla prevenzione delle malattie cardiovascolari mendeliane (v. Capitolo 8 d).

4 d.2 Test post-natali per malattie complesse.

4.d 2.i Concetti generali

Le analisi *genome-wide* hanno avuto un grande impatto nella comprensione delle differenze e perciò della variabilità interindividuale e hanno permesso di mappare un migliaio di loci-malattia associabili a fenotipi di suscettibilità alle malattie più comuni nell'uomo. La suscettibilità a sviluppare una determinata malattia è dovuta alla componente genetica della malattia, ovvero la sua "ereditabilità" riconducibile alle caratteristiche del genoma individuale, distinguendola dalla componente ambientale, intesa come alimentazione, farmaci, microbioma, stili di vita, (esposoma).

L'analisi genetica della suscettibilità alle malattie complesse ha permesso di indagare per la prima volta i meccanismi biologici della variabilità interindividuale, nonché dell'ereditabilità. E' stato così scoperto che le persone differiscono tra loro in media da 4,1 a 5 milioni di varianti di singolo nucleotide (SNVs), almeno 459.000 - 565.000 delle quali si sovrappongono con le regioni regolatorie, che circa una ogni 200 basi è diversa e ogni persona possiede oltre 1500 variazioni che la rendono diversa rispetto alle mappe di riferimento. Delle varianti trascritte, più del 85% sono rare con frequenze alleliche minori (MAFS) al di sotto dello 0,5%. Inoltre se considerassimo solo le varianti putativamente funzionali, il loro numero aumenterebbe di oltre il 95%, a sottolineare l'importanza dell'analisi delle varianti rare, al fine di stabilire con maggiore precisione la suscettibilità ad una malattia o una risposta ad un farmaco.

La suscettibilità genetica è appunto la risultante della variazione di un gene che altera la funzione biologica espressa dal gene all'origine, modificando il rischio di un soggetto di sviluppare una determinata patologia. Si definisce gene di suscettibilità, una variante genetica che conferisce un rischio modificato di contrarre una specifica malattia ma non è di per se sufficiente a causare la malattia. Le variazioni di questi geni sono note come *polimorfismi* e possono variare quantitativamente e qualitativamente. Ad esempio, è stato riconosciuto che vi sono almeno 300 polimorfismi che influenzano lo sviluppo delle patologie cardiovascolari. Tuttavia, nessuno di questi, valutato singolarmente può essere utilizzato per una stima del rischio predittivo né tantomeno come target di terapia. Il potere predittivo dei singoli polimorfismi è limitato proprio dalla loro variabilità a livello di popolazione, dal contesto del genoma nella quale si trovano, dall'architettura genomica (posizione nel gene, presenza di mutazioni aggiuntive, controllo epigenetico, interazione con altri polimorfismi). Soltanto un'analisi complessiva delle varianti di rischio (mediante precisi algoritmi) di un determinato numero di polimorfismi, permette di prevedere statisticamente il rischio di sviluppare una malattia o di rispondere a un intervento terapeutico sulla base della determinazione del genotipo per una o più mutazioni geniche. Un algoritmo (RACE) sviluppato dalle Università di Roma Tor Vergata e Vita e Salute di

Milano ha permesso di valutare il rischio individuale di ogni persona basandosi sull'analisi di 11 geni di suscettibilità alle malattie cardiovascolari congiuntamente alla presenza di tutti gli altri fattori di rischio (fumo, stili di vita, patologie concomitanti, dati di laboratorio clinico, attività culturale). Combinati insieme in un modello a quattro dimensioni, è stato possibile stimare il rischio individuale prospettico in oltre 200 casi con accuratezza e precisione. Questo è un esempio applicativo di medicina personalizzata basato sulla variazione genomica individuale di un set di 11 loci integrato con i fattori di rischio ambientali riferiti al soggetto in esame e non alla popolazione generale.

Questi studi nei prossimi anni si moltiplicheranno in conseguenza della grande quantità di dati clinici appartenenti ai singoli soggetti (cartelle cliniche elettroniche), che saranno collegate a informazioni genotipiche (SNPs) e renderanno possibile *Phenome-Wide association studies (PheWASs)* ovvero, analisi comparative delle varianti genetiche associate a fenotipi multipli utilizzando solo i dati raccolti nelle banche dati. Il metodo PheWAS ha contribuito a definire diversi sottotipi di una malattia ed è determinante negli studi di riposizionamento dei farmaci e nella medicina di precisione. L'approccio PheWASs ha permesso di identificare e mappare con precisione 160 loci-malattie diverse nella regione HLA sul braccio corto del cromosoma 6 in una regione di DNA di circa 4 Mb, tra cui geni di suscettibilità alla schizofrenia, al diabete, alla psoriasi, al lupus e ad altre malattie autoimmuni. Altri ricercatori hanno utilizzato il metodo PheWAS per identificare l'origine di alcune malattie neurologiche, psichiatriche e dermatologiche in segmenti di DNA di origine Neandertaliana. PheWASs può essere utilizzato anche per scoprire condizioni di co-morbidità, come ad esempio la suscettibilità alla paradontite che è co-localizzata con loci di suscettibilità al diabete, all'ipertensione e all'ipercolesterolemia, o anche di individuare sottotipi di pazienti con patologie complesse, come nel diabete di tipo 2, distinguendo su base genetica i soggetti suscettibili ad alcune complicanze, come la nefropatia o la retinopatia. Analogamente, la neuropatia diabetica è stata associata ai polimorfismi di alcuni geni codificanti miRNAs aprendo la strada a nuovi alleli di suscettibilità in geni mai identificati fino ad oggi su base polimorfica. Gli stessi autori hanno identificato polimorfismi "a monte" del gene MIR1279 che risultano associati con lo sviluppo della pericardite nei pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico, indipendentemente dagli altri loci di suscettibilità alla malattia. Questi esempi dimostrano la straordinaria potenza dell'approccio genomico per dissezionare le malattie complesse. Ad esempio hanno identificato come loci di suscettibilità alle malattie autoimmuni, i geni STAT4, IL10, PSORS1C1, PTPN2, ERAP1, TRAF3IP2 e MIR146A, che influenzano la sintomatologia dell'artrite reumatoide in modo pleiotropico e additivo.

Attualmente le ricerche sulle basi biologiche dei caratteri complessi restano essenzialmente oggetto di studio; in questo contesto si va sempre più configurando l'idea che le malattie comuni siano determinate dall'effetto cumulativo di molte variazioni che individualmente conferiscono un rischio di malattia molto modesto o addirittura trascurabile, se non in associazione con molte/moltissime altre variazioni.

L'utilizzo clinico dei polimorfismi di suscettibilità dovrebbe tenere conto di alcune cautele principali. In primo luogo, le persone non dovrebbero sottoporsi a questi test senza conoscere a priori come utilizzare i risultati. In secondo luogo, deve essere chiaro che almeno un test ogni 20, tra quelli con una dichiarata specificità del 95%, fornisce un risultato falso positivo; ne consegue che il sequenziamento completo del genoma di una persona fornisce un risultato contenente almeno 6000 errori. Inoltre, va ricordato che, all'interno dei dati ottenuti, ne vengono evidenziati alcuni di non chiaro significato clinico (i cosiddetti VUS – *Variations of Unknown Significance*), oppure la specificità allelica (posizione in *cis/trans* degli alleli in condizione di eterozigosi) che limitano ulteriormente il potere predittivo di queste analisi. Non ultimo, il valore clinico di un'indagine di questo tipo dipende dalla possibilità di collegare specifiche varianti ad un miglioramento dell'esito clinico, il che di solito non è affatto scontato. La diversità genetica individuale si presenta come un

continuum che va da polimorfismi neutri, attraverso polimorfismi funzionali e suscettibilità alla malattia con varianti di vero significato patologico. E' evidente pertanto che diverse combinazioni di polimorfismi a minore o elevato rischio costituiscono una rete complessa e funzionale con diverse conseguenze cliniche. Infatti, è proprio la combinazione di alleli comuni a bassa penetranza con alleli rari ad elevata penetranza che influenzano l'età di insorgenza e / o la gravità clinica di una malattia complessa. La definizione del rischio per un singolo soggetto non dipende quindi solo dal numero e dalla posizione delle varianti di suscettibilità individuate, ma anche dalla composizione unica del proprio genoma a livello di carico mutazionale. A questo si aggiunge l'impatto fornito dai fattori epigenetici e ambientali che in modo sinergico e a volte antagonista, può contribuire alla definizione del fenotipo (in modo deleterio o protettivo) perturbando l'equilibrio di vie metaboliche specifiche innescando o inibendo il processo patogenetico. Per questa ragione è necessario sviluppare nuovi algoritmi in grado non solo di identificare quelle varianti funzionali di elevato significato clinico ma capaci di elaborare rischi personalizzati interattivi con singoli fattori ambientali e migliorare in tal modo la nostra comprensione della natura della malattia complessa.

4.d 2.ii L'esempio delle malattie cardiovascolari multifattoriali

La cardiopatia ischemica è la prima causa di morte nel mondo occidentale. L'aterosclerosi coronarica è il substrato anatomopatologico che sottende quasi tutte le manifestazioni cliniche (angina cronica stabile, sindromi coronariche acute, morte improvvisa coronarica) della cardiopatia ischemica.

La malattia aterosclerotica coronarica è una malattia complessa alla cui espressione clinica concorrono due meccanismi patogenetici ugualmente importanti: i fattori ambientali comunemente chiamati fattori di rischio; la suscettibilità genetica, cioè tutto il corredo dei geni con i propri polimorfismi che facilitano il processo aterosclerotico.

I fattori ambientali o di rischio, sono stati identificati nei principali studi epidemiologici, ad esempio il *Framingham Heart Study* effettuato a partire dal 1948 nella cittadina statunitense di Framingham (Massachusetts) e più recentemente l'*INTERHEART*, che ha individuato, in ordine decrescente di *odds ratio* o probabilità di associazione il livello di colesterolo, il fumo, il diabete, l'ipertensione, l'obesità, ed ha individuato, come fattori protettivi, il consumo giornaliero di frutta e verdura, l'esercizio fisico e un moderato consumo di alcool. I fattori di stress psico-sociali sono stati classificati come fattori che influenzano negativamente tutti gli altri.

Sono state proposte molte le teorie che hanno cercato di spiegare la formazione della placca aterosclerotica. Quella oggi più accreditata è la teoria metabolica, che pone il colesterolo LDL come punto cardine nella formazione, progressione e destabilizzazione della placca aterosclerotica.

È stato riconosciuto uno stretto legame tra alcuni polimorfismi dei geni che codificano per proteine importanti nei processi biologici alla base della formazione della placca aterosclerotica e della fisiologia cardiocircolatoria e lo sviluppo delle patologie cardiovascolari. Ad esempio è noto che il polimorfismo M235T del gene codificante per l'angiotensinogeno (*AGT*) è strettamente correlato con l'ipertensione arteriosa. Numerosi altri studi hanno riguardato i geni che producono proteine/enzimi attivi nel metabolismo del colesterolo, della coagulazione, delle lipoproteine, dell'aggregazione ed adesione piastrinica, dei processi infiammatori a livello della parete vasale, del collagene e dell'ossidazione delle LDL, nonché dei loro recettori. Tra questi, i geni di maggiore interesse per la definizione della suscettibilità genetica comprendono: i geni del metabolismo lipidico (ApoB, ApoCIII, ApoE, CETP, LPL, PON, TRIB1); dell'ipertensione (ACE, AGT, AT1R1); del metabolismo dell'omocisteina (MTHFR, CBS); della trombosi (FV, FBNGN, GPIIIa); dell'adesione leucocitaria (ELAM) ed

altri geni a funzione sconosciuta ma probabilmente con attività regolatoria, come la regione non codificante 9p21 e regolazione dei geni *CDKN2B* e *CDKN2A*, considerato oggi un polimorfismo ad elevata penetranza nelle malattie cardiovascolari.

Quanti e quali di questi geni di suscettibilità all'aterosclerosi e all'infarto del miocardio possono essere considerati importanti per la predizione della malattia?

Ogni allele di suscettibilità deve essere identificato e classificato in base al proprio *score* genetico di rischio (GRS) risultante dalla combinazione degli alleli di rischio. Un GRS rappresenta l'elemento costante di esposizione al rischio dell'individuo durante tutta la sua vita che naturalmente si interfaccia con gli altri fattori di rischio ambientali. Utilizzando specifici algoritmi, è possibile stabilire un punteggio di rischio genetico (GRS) associato al rischio cardiovascolare individuale e stabilire, l'eventuale effetto additivo o moltiplicativo dei singoli fattori di rischio nella valutazione complessiva del rischio ischemico nella malattia coronarica. Ad esempio, i valori del colesterolo LDL e dei trigliceridi hanno un effetto additivo sul rischio cardiovascolare, quando combinati, ma la loro interazione con il GRS è più complessa e potrebbe avere un effetto moltiplicativo. Questo conferma che la progressione dell'aterosclerosi è la risultante di una combinazione tra il processo infiammatorio e i livelli lipidici. E' bene chiarire subito che un set di geni selezionati esclusivamente in base alla loro funzione nella patogenesi cardiovascolare possono essere utili in termini di predizione del rischio di malattia coronarica. Tuttavia, nessuno di questi geni, valutato singolarmente, può essere utilizzato per una valutazione del rischio predittivo né tantomeno come *target* di terapia. Soltanto un'analisi complessiva delle varianti di rischio (mediante precisi algoritmi) di un determinato set di geni non-pleiotropici validato e qualificato, attraverso opportuni studi di popolazione, e di analisi retrospettive e prospettive, permette di prevedere statisticamente il rischio individuale di sviluppare la malattia aterosclerotica o di rispondere a un intervento terapeutico sulla base della determinazione del genotipo per una o più mutazioni geniche.

Oltre ai polimorfismi che aumentano direttamente il rischio di sviluppare malattie cardiovascolari, esistono alcuni geni che indirettamente aumentano tale rischio. Queste suscettibilità "indirette" sono dovute ad alcuni geni che influenzano comportamenti non salutari come il consumo di alcool e tabacco. L'importanza "comportamentale" nella modificazione del rischio individuale è stata dimostrata in maniera inconfutabile da alcuni studi di popolazione sulle migrazioni. Ad esempio, gli individui giapponesi hanno una più bassa incidenza di sviluppare CVD rispetto agli americani, ma gli americani-giapponesi, che hanno adottato uno stile di vita "occidentale", hanno la stessa incidenza di sviluppare CVD della restante popolazione americana. Un altro drammatico esempio di una popolazione stazionaria, che ha subito un cambiamento ambientale, è quello degli Indiani Pima dell'Arizona. Prima dell'adattamento allo stile di vita occidentale, questi indiani avevano una modesta incidenza di obesità e diabete, attualmente invece queste malattie sono in dilagante crescita in questa popolazione. Molto studi scientifici hanno documentato che la differenza di incidenza delle CVD tra le popolazioni è dovuta principalmente a fattori ambientali. Questo non si può dire tuttavia per le popolazioni che non differiscono nella suscettibilità genetica; per esempio, gli indiani Pima hanno sorprendentemente una bassa incidenza di CVD nonostante l'alta frequenza di diabete. Le interazioni gene-ambiente sono difficili da studiare negli esseri umani, ma gli studi genetico-epidemiologici hanno rivelato alcuni esempi possibili. I Masai, una tribù dell'Africa orientale, hanno una alimentazione estremamente elevata di grassi (la loro dieta è composta quasi interamente da prodotti di origine animale), ma i loro livelli di colesterolo tendono ad essere relativamente bassi. Questo è una conseguenza di una insolita regolazione a feedback negativo della sintesi del colesterolo per ragioni genetiche. D'altra parte, gli eschimesi hanno relativamente scarsa repressione della sintesi del colesterolo in risposta ad una dieta con un elevato contenuto di grassi. Questo è conseguente all'adattamento a condizioni ambientali estreme con basse temperature e dieta ricca di acidi grassi polinsaturi,

che ha permesso di selezionare varianti specifiche di geni codificanti per desaturasi che modulano il metabolismo degli acidi grassi semi essenziali.

L'importanza del GRS nelle malattie cardiovascolari attualmente può essere importante nella valutazione dell'aumento del rischio di un consanguineo di un individuo affetto rispetto alla popolazione generale. Le CVD si presentano di solito dopo i 55 anni, per cui tali valutazioni sono importanti soprattutto negli eventi cardiovascolari precoci. L'utilizzo del GRS nella valutazione del rischio preventivo di malattia coronarica dovrebbe pertanto essere utilizzato nella pratica clinica solo nelle seguenti condizioni:

- consulenza genetica pre- e post-test;
- impiego di polimorfismi non-pleiotropici già analizzati e validati;
- interpretazione del risultato effettuato da un team di esperti con figure professionali differenti (cardiologi, genetisti, bioinformatici);
- il Centro che offre il test deve disporre di database, di programmi e di algoritmi in grado di interconnettere i dati clinici con i dati genetici.

Obiettivi e Raccomandazioni (Cap.4 d 2)

Da quanto esposto emergono le seguenti priorità, rispetto alle quali sono identificabili i relativi interventi (Tabella 8):

- **Promuovere il ricorso alla valutazione della suscettibilità genetica nei pazienti con CVD e di un programma organizzato di screening del GRS nei familiari sani.** La disponibilità di sufficienti evidenze scientifiche mette il Sistema Sanitario in condizione di inserire tale screening in modo sistematico nell'ambito dei servizi offerti alla popolazione di riferimento (come definita dalle Linee-guida: v. dopo). Si identifica quindi un intervento di sanità pubblica con le seguenti caratteristiche: basato su valutazioni di efficacia sperimentale; organizzato per profili di assistenza e quindi non soltanto delegato alla competenza /sensibilità/ iniziativa tecnico-professionale; mirato all'equità e quindi basato sul coinvolgimento attivo della popolazione destinataria; dotato di un esplicito sistema informativo e di valutazione.

Sono disponibili LG e raccomandazioni a livello internazionale ma appare comunque utile verificarne la contestualizzazione nel Sistema Sanitario italiano. È quindi necessario:

- Contestualizzare linee-guida per la valutazione della suscettibilità genetica nei pazienti con CVD e dello GRS nei familiari sani. Tale obiettivo può essere conseguito in armonia con il Sistema nazionale linee guida (SNLG) che è impostato per elaborare raccomandazioni di comportamento clinico basate sugli studi scientifici più aggiornati, secondo il proprio metodo; è riconducibile a tale processo anche la collaborazione con società scientifiche ed esperti di settore. In tale *framework* di livello nazionale potrà essere prodotta una contestualizzazione di una linea-guida internazionale. La successiva fase di implementazione è riconducibile alle responsabilità e metodi della programmazione e *management* dei servizi sanitari regionali e richiede un processo esplicito di recepimento e applicazione

- Organizzazione di un percorso. Assunto che la linea-guida riguarda per definizione la dimensione tecnico-professionale; le raccomandazioni derivate dalla L-G devono portare alla implementazione di un'organizzazione in grado di accogliere la popolazione target in un percorso esplicito, basato su 'nodi organizzativi' chiaramente definiti e procedure di 'ingaggio' precise ed esplicite. Si tratta quindi di definire un percorso diagnostico- terapeutico-assistenziale (PDTA) che prenda in carico gli individui destinatari dello screening.

Tabella 8: Interventi identificabili

Argomento: <i>malattie cardiovascolari polifattoriali</i>		
	Responsabilità operativa	Indicatori per la valutazione di processo
Intervento 1: <i>Screening dei familiari di pazienti con CVD mediante valutazione dello "score" genetico di rischio (GRS)</i>		
Azioni .		
<ul style="list-style-type: none"> • Definizione linee-guida 	intervento 'Centrale'	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> • Implementare linee-guida 	intervento 'Regionale'	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> • Definire PDTA 	intervento 'Regionale'	Definizione del PDTA da parte della Regione: indicatore dicotomico S/N
		Casi trattati all'interno del PDTA: indicatore quantitativo Percentuale sul totale delle prestazioni eseguite in ambito strutture pubbliche/accreditate

4.d.3 Tumori

4.d.3.i Mutazioni germinali per tumori ereditari

1. Tumore della Mammella

Il carcinoma della mammella (CM) è uno dei tumori maligni a maggior frequenza (29%), al primo posto per incidenza [si stima che ogni anno in Italia vengano colpite circa 48.000 donne (dati AIOM_AIRTUM 2015)] e la prima causa di morte per patologia oncologica tra le donne.

Anche se la maggior parte dei CM ha una patogenesi multifattoriale, il 5-7% risulta essere legato prevalentemente a fattori ereditari, che agiscono con meccanismi mendeliani.

Circa il 2% dei casi è determinato da alterazioni a carico di due geni, BRCA1 e BRCA2 ("geni BRCA"), responsabili di predisposizione ereditaria ad alta penetranza. Tuttavia, considerando solo le donne malate con età inferiore a 40 anni, la percentuale di quelle che presentano varianti patogenetiche a livello di questi geni sale al 10%.

La prevalenza di varianti patogenetiche a carico dei geni BRCA nella popolazione generale è di circa 1:400; questo significa che, applicata tale frequenza alla popolazione residente in Italia nel 2015, si può stimare che siano circa 152000 le persone che presentano tali varianti nel nostro Paese.

Alterazioni di questi geni sono associate ad un rilevante e significativo aumento della probabilità di comparsa del CM rispetto alla popolazione generale, con tendenza ad età di insorgenza precoce e rischio elevato anche di neoplasie dell'ovaio (il rischio cumulativo medio stimato di cancro mammario all'età di 70 anni è del 57% in caso di variante patogenetica di BRCA1 e 49% in caso di BRCA2; il rischio, invece, di sviluppare cancro ovarico- CO- è rispettivamente 40% e 18% per varianti di BRCA1 e BRCA2). Tra le donne con diagnosi di cancro dell'ovaio, infatti, l'8-10% è legato ad alterazioni genetiche a livello di BRCA 1/2.

Lo screening personalizzato per il cancro della mammella.

A partire dai primi anni '90, lo screening del tumore al seno ha portato a una riduzione della mortalità superiore al 30% ma oggi è necessario intervenire con programmi di screening personalizzati per definire in maniera accurata il rischio individuale delle donne allo scopo di progettare percorsi di prevenzione diversi e adatti al profilo di ogni singola donna attraverso la complementarietà di fattori di rischio "tradizionali" come la storia familiare e i fattori riproduttivi, la densità mammografica e la presenza di varianti geniche comuni associate per la definizione di uno score che consenta una stratificazione del rischio (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs).

E' noto come singole varianti geniche associate all'insorgenza di cancro, possano singolarmente contribuire in piccola parte alla valutazione del rischio di insorgenza della malattia stessa. Per contro, è altresì noto come la valutazione dell'effetto combinato di tutti gli SNPs associati e noti possa essere utile nel definire meglio il rischio.

In quest'ottica, la raccolta delle informazioni relative a SNPs di suscettibilità noti, e l'adozione di un semplice modello moltiplicativo, può essere impiegato per la definizione di un modello di rischio per la previsione del rischio stesso [*polygenic risk score* (PRS)].

Negli ultimi anni, differenti studi hanno dimostrato come, usando un modello combinato di valutazione del rischio su base genetica, si possano identificare soggetti a diverso livello di rischio di sviluppare cancro al

seno o alla prostata e di come, questa stratificazione, potrebbe orientare le strategie di prevenzione e di screening. Tuttavia, ad oggi, mancano ancora sufficienti evidenze a supporto di queste previsioni e sarebbero auspicabili ulteriori studi di validazione di tipo caso-controllo o, preferibilmente, studi di coorte prospettici.

Per il cancro alla mammella, studi di associazione sull'intero genoma (GWAS) hanno portato alla scoperta di numerose varianti a basso rischio, alcune delle quali associate allo status del recettore estrogenico. Un grosso studio condotto dal *Breast Cancer Association Consortium (BCAC)*, come parte del *Collaborative Oncological Gene-Environment Study (COGS)*, ha permesso di identificare nuove varianti di rischio attraverso la genotipizzazione di oltre 40.000 casi e 40.000 controlli sani. Il risultato di questa ricerca è stata l'identificazione di un numero maggiore di SNPs associati al cancro al seno: da 27 a più di 70 e di ulteriori varianti associate ai tumori ER-.

Il *Predicting Risk of Cancer at Screening Study (PROCAS)*, è uno studio prospettico di stima del rischio di insorgenza di cancro alla mammella. L'analisi ha incluso 50,628 donne sottoposte a screening mammografico di età compresa tra i 47 e i 73 anni reclutate tra ottobre 2009 e settembre 2013. I risultati hanno evidenziato come la densità mammografica può aiutare nel perfezionamento della stima del rischio in combinazione con il modello di Tyrer-Cuzick o il modello di Gail. Successivamente, lo stesso gruppo di ricercatori ha considerato la densità mammografica e 18 varianti di suscettibilità (SNP18) in combinazione al modello di Gail e Tyrer-Cuzick (TC) per calcolare la stima del rischio sulla base dei tumori identificati tra due round di screening triennali. La densità mammografica e i SNP18, quando combinati con il modello TC o di Gail, identificano un maggior numero di donne ad alto rischio allo screening, ed è associata con una maggiore stadio della malattia. Circa il 16% delle donne sono state identificate come ad alto rischio combinando TC e densità mammografica e SNP18 che sembra aggiungere ulteriore precisione al modello. L'inclusione di ulteriori SNPs di nuova identificazione potrà forse aumentare la capacità di discriminazione del rischio per interventi di sorveglianza e di riduzione del rischio mirati.

Tipo di intervento.

I percorsi di prevenzione primaria, sia di sorveglianza che terapeutici, per pazienti portatori, o familiari per mutazione di BRCA1/2 sono specifici a seconda delle diverse fasce d'età e della storia personale/familiare. Questi percorsi sono stati raccolti in dettagliate linee guida elaborate da numerosi enti; per il carcinoma della mammella ricordiamo le linee guida NICE, quelle NCCN (https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast_risk.pdf).

Valutazioni.

Allo stato attuale, i test genetici hanno lo scopo di identificare casi attribuibili a sindromi mendeliane che determinano alto rischio. Non sono ancora disponibili test genetici applicabili per screening della popolazione generale, poiché i marcatori genetici di rischio moderato individuati mediante studi di associazione caso-controllo dall'analisi di casistiche di tumori non selezionati sulla base della storia familiare e delle caratteristiche ereditarie non sono ancora sufficientemente specifici. Diventa quindi molto interessante approfondire questo ulteriore campo di indagine per garantire sempre più precisa "*personalized preventive medicine*" che possa effettivamente migliorare il percorso preventivo.

2. *Sindrome di Lynch*

La maggior parte dei tumori del colon-retto può essere definita sporadica, mentre circa il 30% presenta ricorrenza familiare, e tra questi una piccola parte, stimata intorno al 3-5%, insorge in persone che hanno una predisposizione genetica ereditaria. Questi casi sono riconducibili a sindromi ereditarie caratterizzate da varianti patogenetiche ad alta penetranza, trasmesse su base mendeliana.

La più diffusa è la Sindrome di Lynch, che rappresenta il 2-3% dei CCR; e si stima che nel nostro Paese ci siano tra i 6000 e i 9000 soggetti con accertata sindrome di Lynch. Questa sindrome è causata da varianti patogenetiche che coinvolgono principalmente 5 geni (MSH2, MLH1, MSH6, PMS2, EPCAM) che codificano per proteine coinvolte nel processo del Mismatchrepair (MMR) e per una molecola di adesione epiteliale (EPCAM). Le prime quattro hanno la funzione di riparare gli errori commessi durante la replicazione e la ricombinazione del DNA, pertanto la loro perdita risulta in un fenotipo di ipermutazione di determinate regioni del DNA- fenomeno conosciuto come Instabilità dei microsatelliti (MSI), l'ultima proteina invece ruolo nei processi di adesione omotipica delle cellule epiteliali.

Essere portatori di queste varianti patogenetiche comporta un rischio cumulativo di sviluppare cancro del colon-retto tra 35% e 70% nell'arco della vita. Il rischio è un po' più basso nelle donne, che hanno però una probabilità all'incirca uguale di ammalarsi di cancro dell'endometrio. Tale sindrome è associata all'insorgenza anche di altre neoplasie, seppure meno frequenti rispetto a quelle di colon ed endometrio.

Sulla base dei dati epidemiologici risulta evidente che queste diverse forme mendeliane ad aumento della probabilità di comparsa di CM e CCR rispetto alla popolazione generale necessitano di percorsi clinico-assistenziali di prevenzione primaria atti ad abbattere i relativi tassi di incidenza di malattia e di mortalità

Tipo di intervento.

Come già indicato per il carcinoma della mammella, i percorsi di prevenzione primaria, sia di sorveglianza che terapeutici, per i pazienti portatori, o familiari per mutazione per colon/Lynch sono specifici a seconda delle diverse fasce d'età e della storia personale/familiare.

Le linee guida a cui fare riferimento sono essenzialmente le linee guida NCCN (https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colorectal_screening.pdf)

4.d.3.ii Mutazioni germinali per suscettibilità ai tumori

1. Cancro alla prostata

Per quanto concerne il cancro alla prostata un serio problema è rappresentato dalla sovradiagnosi. Recentemente, le linee-guida della *US Preventive Services Task Force* hanno sottolineato come non si debbano basare gli screening per il cancro alla prostata sulla valutazione dell'antigene prostatico PSA perchè i danni attesi (falsi-positivi, overdiagnosi, overtrattamento) sono superiori ai potenziali benefici. La stratificazione della popolazione in diversi gruppi in base al rischio genetico, da solo o in combinazione con altri fattori di rischio (come l'età e la storia familiare), permetterebbe di offrire lo screening in modo differenziato alla popolazione con miglioramento del rapporto danno beneficio.

Ad oggi, numerosi studi GWAS hanno permesso di individuare più di 70 loci di suscettibilità per il cancro alla prostata. I rischi associati a queste varianti sono definiti generalmente modesti, ma in combinazione

potrebbero fornire la base della prevenzione mirata. Sinteticamente, le evidenze scientifiche disponibili, da un lato mettono in luce il potenziale di una *signature* poli-genica per la definizione di un modello PRS di previsione del rischio; dall'altro evidenziano alcune criticità da tenere in considerazione per lo sviluppo di programmi di screening stratificati. Un recente studio mostra come le mutazioni genetiche ereditarie potrebbero giocare un ruolo più importante del previsto nell'insorgenza di un carcinoma della prostata metastatico. Le alterazioni in geni che hanno la funzione di riparare il Dna (come BRCA1 e BRCA2) sarebbero infatti presenti in quasi il 12 % dei pazienti con un tumore prostatico in fase avanzata. La conclusione è giunta dopo aver analizzato i dati relativi a 692 uomini con un carcinoma prostatico metastatico e aver individuato 16 diverse mutazioni (fra le quali, oltre quelle BRCA, anche a carico dei geni ATM, CHEK2, RAD51D e PALB2) in 82 pazienti (ovvero l'11,8% del totale), indipendentemente dall'età o dalla storia familiare. In particolare, i malati di cancro alla prostata metastatico con mutazioni BRCA2 risultano avere il 18 % di rischio in più rispetto a quelli sani. Appare quindi molto importante che anche i maschi con cancro alla prostata vengano sottoposti al test genetico sulla scia di quanto già accade nelle femmine con un tumore alla mammella.

4.d.3.iii Mutazioni somatiche

La risposta ai trattamenti chemioterapici, come per altro quella a qualsiasi altro tipo di farmaco, è quantificabile in una misura media in quanto alcuni pazienti non rispondono affatto alla terapia, altri hanno una risposta buona e altri sperimentano effetti collaterali di grado più o meno elevato.

Questa diversa risposta dipende dalla variabilità interindividuale, caratteristica di sua natura multifattoriale in quanto dipende dall'età, dal peso, dallo stato di salute generale, da diversi fattori ambientali (clima, stile di vita, fattori culturali quali ad esempio la religione) e dai fattori genetici.

Nello specifico sappiamo che i polimorfismi genetici individuali possono influire sulla risposta ai chemioterapici; la stessa tossicità è spesso legata al genotipo individuale dei tessuti non tumorali. Questo perché le cellule tumorali sono sostanzialmente uguali a quelle degli altri tessuti a meno di nuove mutazioni.

Analizzare le caratteristiche del tessuto somatico neoplastico permette, in alcuni casi, di definire da una popolazione generale i seguenti gruppi di pazienti:

- Pazienti che rispondono al trattamento e che sperimentano poca tossicità
- Pazienti che rispondono al trattamento e che sperimentano molta tossicità
- Pazienti che non rispondono al trattamento e che sperimentano poca tossicità
- Pazienti che non rispondono al trattamento e che sperimentano molta tossicità

Di seguito un elenco di farmaci per i quali lo stato mutazionale di cellule somatiche è verificato ai fini di una ottimale risposta:

Principio attivo	Mutazione verificata sul somatico	Patologia di riferimento
Trastuzumab	Espressione recettore HER2	Mammella
Cetuximab	Espressione recettore EGFR e stato mutazionale gene RAS	Colon

Panitunumab	Espressione recettore EGFR e stato mutazionale gene RAS	Colon
Gefitinib	Espressione recettore TKI e Espressione recettore EGFR	Polmone
Erlotinib	Espressione recettore TKI e Espressione recettore EGFR	Polmone
Pertuzumab	Espressione recettore HER2	Mammella
Imatinib	Inibizione di Abl	Leucemia
Olaparib	Mutazione gene BRCA	Ovaio
Crizotinib	Riarrangiamento gene ALK	Polmone
Tamoxifene	Mutazione gene CYP2D6	Mammella

Obiettivi e Raccomandazioni (Cap.4 d 3)

Da quanto esposto emergono le seguenti priorità, rispetto alle quali sono identificabili i relativi interventi (Tabella 9):

- **Lo screening personalizzato per il cancro della mammella.** La costruzione di uno score che consenta una stratificazione del rischio di CM, nonché valutare l'applicabilità dello score prodotto per proporre una modulazione personalizzata dello screening sono obiettivi considerati nel Cap7 (Topic V Opportunità per la sostenibilità di sistema mediante la prevenzione secondaria finalizzata alla riduzione del *burden* di malattia del cancro al seno)
- **Prevenzione primaria per i pazienti portatori, o familiari per mutazione di BRCA1/2.** La sorveglianza delle donne senza storia personale di tumore è prevista in uno degli obiettivi del Piano nazionale della prevenzione 2014-18, secondo le linee guida prodotte dal CCM.
- **Terapia preventiva per donne a rischio moderatamente aumentato o ad alto rischio.** La disponibilità di sufficienti evidenze scientifiche mette il Sistema Sanitario in condizione di inserire tale intervento in modo sistematico nell'ambito dei servizi offerti alla popolazione di riferimento. Sono disponibili LG e raccomandazioni a livello internazionale ma appare comunque utile verificarne la contestualizzazione nel Sistema Sanitario italiano. Tale obiettivo può essere conseguito in armonia con il Sistema nazionale linee guida (SNLG)
- **Mastectomia profilattica e Ooforectomia profilattica.** La disponibilità di sufficienti evidenze scientifiche mette il Sistema Sanitario in condizione di inserire tale intervento in modo sistematico nell'ambito dei servizi offerti alla popolazione di riferimento. Sono disponibili LG e raccomandazioni a livello internazionale ma appare comunque utile verificarne la contestualizzazione nel Sistema Sanitario italiano. Tale obiettivo può essere conseguito in armonia con il Sistema nazionale linee guida (SNLG). Successivamente, al fine di rendere accessibile a tutta la popolazione target tale

intervento è necessario organizzare un percorso (PDTA). Assunto che la linea-guida riguarda per definizione la dimensione tecnico-professionale; le raccomandazioni derivate dalla L-G devono portare alla implementazione di un'organizzazione in grado di accogliere la popolazione target in un percorso esplicito, basato su 'nodi organizzativi' chiaramente definiti e procedure di 'ingaggio' precise ed esplicite. Si tratta quindi di definire un PDTA che prenda in carico gli individui destinatari di tali interventi.

- **Terapia ormonale sostitutiva (HRT) per donne senza storia personale di carcinoma mammario sottoposte a salpingo-ooforectomia prima dell'insorgenza dello stato menopausale.** La disponibilità di sufficienti evidenze scientifiche mette il Sistema Sanitario in condizione di inserire tale intervento in modo sistematico nell'ambito dei servizi offerti alla popolazione di riferimento. Sono disponibili LG e raccomandazioni a livello internazionale ma appare comunque utile verificarne la contestualizzazione nel Sistema Sanitario italiano. Tale obiettivo può essere conseguito in armonia con il Sistema nazionale linee guida (SNLG) nell'ambito dell'intervento di cui sopra.
- **Percorsi di prevenzione primaria per i pazienti portatori, o familiari per mutazione per colon/Lynch, comprensivamente della prevenzione di carcinomi extra-colon.** La disponibilità di sufficienti evidenze scientifiche mette il Sistema Sanitario in condizione di inserire tale intervento in modo sistematico nell'ambito dei servizi offerti alla popolazione di riferimento. Sono disponibili LG e raccomandazioni a livello internazionale ma appare comunque utile verificarne la contestualizzazione nel Sistema Sanitario italiano. Tale obiettivo può essere conseguito in armonia con il Sistema nazionale linee guida (SNLG). Successivamente, al fine di rendere accessibile a tutta la popolazione target tale intervento è necessario organizzare un percorso (PDTA). Assunto che la linea-guida riguarda per definizione la dimensione tecnico-professionale; le raccomandazioni derivate dalla L-G devono portare alla implementazione di un'organizzazione in grado di accogliere la popolazione target in un percorso esplicito, basato su 'nodi organizzativi' chiaramente definiti e procedure di 'ingaggio' precise ed esplicite. Si tratta quindi di definire un percorso PDTA che prenda in carico gli individui destinatari dello screening.
- **Terapia preventiva con aspirina nella sindrome di Lynch.** La disponibilità di sufficienti evidenze scientifiche mette il Sistema Sanitario in condizione di inserire tale intervento in modo sistematico nell'ambito dei servizi offerti alla popolazione di riferimento. Sono disponibili LG e raccomandazioni a livello internazionale ma appare comunque utile verificarne la contestualizzazione nel Sistema Sanitario italiano. Tale obiettivo può essere conseguito in armonia con il Sistema nazionale linee guida (SNLG)
- **Test genetico per mutazioni germinali nel cancro alla prostata.** La disponibilità di sufficienti evidenze scientifiche mette il Sistema Sanitario in condizione di inserire tale intervento in modo sistematico nell'ambito dei servizi offerti alla popolazione di riferimento. Sono disponibili LG e raccomandazioni a livello internazionale ma appare comunque utile verificarne la contestualizzazione nel Sistema Sanitario italiano. Tale obiettivo può essere conseguito in armonia con il Sistema nazionale linee guida (SNLG).

Tabella 9: Interventi identificabili

Argomento: Mutazioni germinali per tumori ereditari		
	Responsabilità operativa	Indicatori per la valutazione di processo
Intervento 1: <i>Terapia preventiva per donne a rischio moderatamente aumentato o ad alto rischio</i>		
Azioni .		
<ul style="list-style-type: none"> • Contestualizzare linee-guida 	intervento 'Centrale'	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> • Implementare linee-guida 	intervento 'Regionale'	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N
Intervento 2: <i>Mastectomia profilattica e Ooforectomia profilattica (comprensivamente dell'eventualità di Terapia ormonale sostitutiva)</i>		
<ul style="list-style-type: none"> • Contestualizzare linee-guida 	intervento 'Centrale'	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> • Implementare linee-guida 	intervento 'Regionale'	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> • Definire PDTA 	intervento 'Regionale'	Definizione del PDTA da parte della Regione: indicatore dicotomico S/N
		Casi trattati all'interno del PDTA: indicatore quantitativo Percentuale sul totale delle prestazioni eseguite in ambito strutture pubbliche/accreditate

Intervento 3: <i>Percorsi di prevenzione primaria per i pazienti portatori, o familiari per mutazione per colon/Lynch, comprensivamente della prevenzione di carcinomi extra-colon.</i>		
<ul style="list-style-type: none"> Contestualizzare linee-guida 	intervento 'Centrale'	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> Implementare linee-guida 	intervento 'Regionale'	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> Definire PDTA 	intervento 'Regionale'	Definizione del PDTA da parte della Regione: indicatore dicotomico S/N
		Casi trattati all'interno del PDTA: indicatore quantitativo Percentuale sul totale delle prestazioni eseguite in ambito strutture pubbliche/accreditate
Intervento 4: <i>Terapia preventiva con aspirina nella sindrome di Lynch</i>		
<ul style="list-style-type: none"> Contestualizzare linee-guida 	intervento 'Centrale'	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> Implementare linee-guida 	intervento 'Regionale'	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N
Intervento 5: <i>Test genetico per mutazioni germinali nel cancro alla prostata</i>		
<ul style="list-style-type: none"> Contestualizzare linee-guida 	intervento	Disponibilità di linee guida:

	'Centrale'	indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> Implementare linee-guida 	intervento 'Regionale'	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N

Bibliografia

1. ACOG Committee Opinion. Update on Carrier screening for cystic fibrosis. N.486, April 2011
2. Zlotogora et al. Population programs for the detection of couples at risk for severe monogenic genetic diseases Hum Genet (2009) 126:247–253
3. Abeliovich, D. et al. Cystic fibrosis heterozygote screening in the orthodox community of Ashkenazi Jews: the Dor Yeshorim approach and heterozygote frequency. European Journal of Human Genetics (1996) 4, 77–82
4. Castellani C et al. Association Between Carrier Screening and Incidence of Cystic Fibrosis JAMA. 2009;302(23):2573-2579
5. Hale JE, Parad RB, Comeau AM. Newborn screening showing decreasing incidence of cystic fibrosis. N Engl J Med. 2008;358(9):973-974
6. Larson JL et al. Validation of a high resolution NGS method for detecting spinal muscular atrophy carriers among phase 3 participants in the 1000 Genomes Project. BMC Med Genet. 2015 Oct 29;16:100
7. Wei X et al. Targeted next-generation sequencing as a comprehensive test for patients with and female carriers of DMD/BMD: a multi-population diagnostic study. Eur J Hum Genet. 2014 Jan;22(1):110-8
8. Morinière V et al. Improving mutation screening in familial hematuric nephropathies through next generation sequencing. J Am Soc Nephrol. 2014 Dec;25(12):2740-51.
9. Bell CJ et al. Carrier testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. Sci Transl Med. 2011 Jan 12;3(65):65ra4
10. Documento Tecnico di Indirizzo per ridurre il carico di malattia del Cancro. Intesa Stato-Regioni del 30/10/14
11. <http://www.snlg-iss.it>
12. Definizione di PDTA. http://www.salute.gov.it/imgs/c_17_pubblicazioni_1572_allegato.pdf
13. Nicolaides KH et al. First-trimester contingent screening for trisomies 21, 18 and 13 by biomarkers and maternal blood cell-free DNA testing. Fetal Diagn Ther. 2014;35(3):185-92
14. Gil MM et al. Analysis of Cell-Free DNA in Maternal Blood in Screening for Aneuploidies: Meta-Analysis. Fetal Diagn Ther. 2014;35:156–173. Gil MM, Quezada MS, Revello R, Akolekar E, Nicolaides KH. Analysis of cell-free DNA in maternal blood in screening for fetal aneuploidies: updated meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol. 2015; 45:249-266

15. Huang X et al. Noninvasive prenatal testing of trisomies 21 and 18 by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA in twin pregnancies. *Prenat Diagn.* 2014;34(4):335-340
16. Bevilacqua E et al. Performance of screening for aneuploidies by cell-free DNA analysis of maternal blood in twin pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(1):61-66
17. Chitty LS et al. New aids for non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia : dysmorphic features, charts of fetal size and molecular confirmation using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011; 37:283-289
18. Chitty LS et al. Safer, accurate prenatal diagnosis of thanatophoric dysplasia using ultrasound and cell free fetal DNA. *Prenat Diagn* 2013;33:416-423
19. Lench N et al. The clinical implementation of noninvasive prenatal diagnosis for single gene disorders: challenges and progress made. *Prenat Diagn.* 2013;33:555-562.
20. Everett TR, Chitty LS. Cell-free fetal DNA: The new tool in fetal medicine. *Ultrasound in Obst Gynecol* 2015;45:499-507
21. Linee Guida Ministero della Salute. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2381_allegato.pdf
22. Carss KJ et al. Exome sequencing improves genetic diagnosis of structural fetal abnormalities revealed by ultrasound. *Hum Mol Genet.* 2014 Jun 15; 23(12):3269-77
23. Mucciolo M et al. Next Generation Sequencing Approach in a Prenatal Case of Cardio-Facio-Cutaneous Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2016 Jun 16;17(6)
24. Zhen L et al. Prenatal DNA diagnosis of Noonan syndrome in a fetus with increased nuchal translucency using next-generation sequencing. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016 Jun;201:229-30
25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
26. Hollegaard et al. Archived neonatal dried blood spot samples can be used for accurate whole genome and exome-targeted next-generation sequencing. *Molecular genetics and metabolism*, 2013
27. Poulsen et al. High-Quality Exome Sequencing of Whole-Genome Amplified Neonatal Dried Blood Spot DNA. *Plos One*, 2016
28. Bodian et al. Utility of whole-genome sequencing for detection of newborn screening disorders in a population cohort of 1,696 neonates. *Genetics in medicine*, 2016
29. Botkin, Rothwel. Whole Genome Sequencing and Newborn Screening. *Ethics in Medical Genetics*, 2016
30. Francescatto, Katsanis. Newborn screening and the era of medical genomics. *Seminars in Perinatology*, 2015
31. Frankel, Pereira, McGuire. Potential Psychosocial Risks of Sequencing Newborns. *Pediatrics*, 2015
32. Howard et al, endorsed by the European Society of Human Genetics. Whole-genome sequencing in newborn screening? A statement on the continued importance of targeted approaches in newborn screening programmes. *European Journal of Human Genetics*, 2015
33. Joseph et al. Parental Views on Expanded Newborn Screening Using Whole-Genome Sequencing. *Pediatrics*, 2015
34. Landau et al. Genomics in Newborn Screening. *The journal of paediatrics*, 2013
35. Lefterova et al. Next-Generation Molecular Testing of Newborn Dried Blood Spots for Cystic Fibrosis. *The journal of molecular diagnostics*, 2015

36. Lewis et al. Supporting Parental Decisions About Genomic Sequencing for Newborn Screening: The NC NEXUS Decision Aid. *Pediatrics*, 2016
37. Lim et al. Next-generation sequencing using a pre-designed gene panel for the molecular diagnosis of congenital disorders in pediatric patients. *Human genomics*, 2015
38. Waisbren et al. Psychosocial Factors Influencing Parental Interest in Genomic Sequencing of newborns. *Pediatrics*, 2016
39. Wheeler et al. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature*. 2008 Apr 17;452(7189):872-6
40. Levy et al. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol*. 2007 Sep 4;5(10):e254
41. Jun Wang et al. The diploid genome sequence of an Asian individual. *Nature* 456, 60-65 (6 November 2008)
42. Choi JK, Kim SC. Environmental effects on gene expression phenotype have regional biases in the human genome. *Genetics*. 2007 Apr;175(4):1607-13
43. Golbus et al. Targeted analysis of whole genome sequence data to diagnose genetic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014 Dec;7(6):751-9
44. C J Carroll et al. Next-generation sequencing for mitochondrial disorders. *Br J Pharmacol*. 2014 Apr; 171(8): 1837–1853.
45. Desmond et al. Clinical Actionability of Multigene Panel Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Risk Assessment. *JAMA Oncol*. 2015 Oct;1(7):943-512015
46. Kapoor NS et al. Multigene Panel Testing Detects Equal Rates of Pathogenic BRCA1/2 Mutations and has a Higher Diagnostic Yield Compared to Limited BRCA1/2 Analysis Alone in Patients at Risk for Hereditary Breast Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015 Oct;22(10):3282-8
47. Bonnefond et al. Whole-Exome Sequencing and High Throughput Genotyping Identified *KCNJ11* as the Thirteenth MODY Gene. *Plos One*, 2012
48. Hedberg et al. Autosomal dominant myofibrillar myopathy with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy 7 is caused by a DES mutation. *Eur J Hum Genet*. 2012 Sep;20(9):984-5
49. Adam R. et al. Exome Sequencing Identifies Biallelic *MSH3* Germline Mutations as a Recessive Subtype of Colorectal Adenomatous Polyposis. *AJHG* Volume 99, Issue 2, p337–351, 4 August 2016
50. Eurordis – Rare Diseases Europe. 2007
51. Evans et al. The i5K Initiative: advancing arthropod genomics for knowledge, human health, agriculture, and the environment. *J Hered*. 2013 Sep-Oct;104(5):595-600.
52. Green RC et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med*. 2013 Jul;15(7):565-74
53. American College of Medical Genetics and Genomics. Recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. 2013
54. Hehir-Kwa JY et al. Towards a European consensus for reporting incidental findings during clinical NGS testing. *Eur J Hum Genet*. 2015 Dec;23(12):1601-6.
55. Gabriel Lázaro-Muñoz. Challenges for Implementing a PTSD Preventive Genomic Sequencing Program in the U.S. Military. *47 Case W. Res. J. Int'l L*.87 (2015)
56. Andreasen Ole A et al. Improved Detection of Common Variants Associated with Schizophrenia and Bipolar Disorder Using Pleiotropy-Informed Conditional False Discovery Rate. *PLOS Genetics*. 2013
57. Romeo F et al. Beyond the cardiovascular risk charts: the new way of hybrid profiles. *Journal of Cardiovascular Medicine*. December 2016 - Volume 17 - Issue 12 - p 851–854

58. Simonti CN et al. The phenotypic legacy of admixture between modern humans and Neandertals. *Science*. 2016 Feb 12;351(6274):737-41
59. Denny JC et al. Phenome-Wide Association Studies as a Tool to Advance Precision Medicine. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2016 Aug 31;17:353-73.
60. Ciccacci C et al. Common polymorphisms in MIR146a, MIR128a and MIR27a genes contribute to neuropathy susceptibility in type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2014 Aug;51(4):663-71.
61. Ciccacci C et al. A polymorphism upstream MIR1279 gene is associated with pericarditis development in Systemic Lupus Erythematosus and contributes to definition of a genetic risk profile for this complication. *Lupus*. 2016 Nov 22
62. Ciccacci C et al. Polymorphisms in STAT-4, IL-10, PSORS1C1, PTPN2 and MIR146A genes are associated differently with prognostic factors in Italian patients affected by rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2016 Nov;186(2):157-163.
63. I numeri del cancro in Italia 2015. AIRTUM. Disponibile in: http://www.registri-tumori.it/PDF/AIOM2015/I_numeri_del_cancro_2015.pdf
64. AIOM (Associazione Italiana Oncologia Medica). Linee guida NEOPLASIE DELLA MAMMELLA Edizione 2015 www.aiom.it
65. Pimaco.it – Il portale italiano delle malattie complesse. Disponibile in: <http://www.pimaco.it/sito/index.php/malattie-complesse/cancro-ereditario-del-colon-retto>
66. ichailidou, K., et al. Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk *Nature Genetics* 45, 353–361 (2013)
67. Rosalind A Eeles, Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array *Nature Genetics* 45, 385–391 (2013)
68. Fergus J. Couch, et al. Genome-Wide Association Study in BRCA1 Mutation Carriers Identifies Novel Loci Associated with Breast and Ovarian Cancer Risk *PLOS Genetics* 9(3), 2013
69. Mia M. Gaudet, et al. Identification of a BRCA2-Specific Modifier Locus at 6p24 Related to Breast Cancer Risk *PLOS Genetics* March 27, 2013 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003173>
70. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature*. 2007;447(7148):1087– 1093
71. Broeks A, et al. Low penetrance breast cancer susceptibility loci are associated with specific breast tumor subtypes: findings from the Breast Cancer Association Consortium. *Hum Mol Genet*. 2011;20(16):3289–3303
72. Garcia-Closas M, et al. Genome-wide association studies identify four ER negative-specific breast cancer risk loci. *Nat Genet*. 2013;45(4):392–398
73. Michailidou K, et al. Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nat Genet*. 2013;45(4):353–361
74. French JD, et al. Functional variants at the 11q13 risk locus for breast cancer regulate cyclin D1 expression through longrange enhancers. *Am J Hum Genet*. 2013;92(4):489–503
75. Bojesen SE, Pooley KA, Johnatty SE, et al. Multiple independent variants at the TERT locus are associated with telomere length and risks of breast and ovarian cancer. *Nat Genet*. 2013;45(4):371–384
76. Adam R. Brentnall, et al. Mammographic density adds accuracy to both the Tyrer-Cuzick and Gail breast cancer risk models in a prospective UK screening cohort. *Breast Cancer Research* (2015) 17:147

77. DG Evans, et al. Mammographic density and SNPs add to Tyrer-Cuzick and Gail model breast cancer risk in a UK screening cohort. Thirty-Eighth Annual CTCR-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium; December 8-12, 2015; San Antonio, TX
78. <https://www.nice.org.uk/guidance/cg164>
79. Pimaco.it – Il portale italiano delle malattie complesse. Disponibile in: <http://www.pimaco.it/sito/index.php/malattie-complesse/cancro-ereditario-del-colon-retto>
80. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet*. 2011 17;378(9809):2081-7
81. Moyer VA; US Preventive Services Task Force. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 2012;157:120–134
82. Eeles R, et al. The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. *Nat Rev Urol* 2014;11:18–31
83. Pritchard C et al. Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2016 Aug 4;375(5):443-53

CAPITOLO 5

La genomica nella terapia.

5.a Risposta ai farmaci e farmacogenomica

Le rapide innovazioni scientifiche degli ultimi anni in ambito di valutazione del genoma degli individui, hanno permesso l'identificazione di varianti associate all'insorgenza, alla cura ed alla prognosi di varie patologie e con un potenziale impatto nella valutazione della risposta alle terapie. Nonostante l'analisi e l'interpretazione delle informazioni genomiche costituisca ancora un processo di non facile risoluzione, in molti casi l'identificazione di specifici profili molecolari ha permesso la stratificazione di sottogruppi di pazienti caratterizzati da una migliore risposta alle terapie farmacologiche. Il profilo genomico di ciascun individuo è in grado di influenzare pressoché tutti gli aspetti di una malattia e il suo trattamento, inclusa l'insorgenza, il decorso o il rischio di recidiva, il farmaco o classe di farmaci con maggiore probabilità di risposta, nonché la dose terapeutica, la natura e la portata delle risposte favorevoli al trattamento e la tossicità del farmaco. Con il termine *farmacogenomica* ci si riferisce allo studio dell'esposizione e della risposta ai farmaci in relazione alle varianti del DNA ed alle caratteristiche dell'RNA. La farmacogenomica si focalizza sull'identificazione delle varianti geniche o genomiche che influenzano la risposta ai medicinali attraverso alterazioni di tipo farmacocinetico, farmacodinamico, attraverso variazioni nel target farmacologico o la perturbazione del *pathway* biologico che caratterizza la sensibilità di un paziente all'effetto di un determinato farmaco. Le evidenze molecolari che emergono dalle strategie di sequenziamento dell'intero genoma o di specifici geni richiedono una convalida indipendente prima che possano essere tradotti in diagnostica clinica. Il processo di convalida può essere facilitato da una maggiore comprensione dei meccanismi che determinano come le varianti identificate alterano la risposta ai farmaci.

Utilizzo dell'informazione farmacogenomica nella pratica clinica

Il nuovo concetto di *Precision Medicine* si riferisce a strategie di prevenzione e trattamento delle patologie che tengano conto della variabilità individuale per la personalizzazione delle terapie. Questi approcci hanno recentemente trovato spazio grazie allo sviluppo di *databases* biologici su larga scala, metodi ad alta processività per la caratterizzazione molecolare dei pazienti (proteomica, metabolomica, genomica, tecnologie sanitarie mobili) e strumenti di calcolo per l'analisi di grandi *dataset*. In relazione ad un potenziale utilizzo nella pratica clinica, le varianti farmacogenomiche possono essere suddivise in due macro categorie:

- *Prevenzione*: le varianti farmacogenomiche possono fornire indicazioni preliminari sulla manifestazione di eventi avversi ed effetti collaterali in relazione all'assunzione di specifici principi attivi ancor prima che si manifesti la condizione patologica. Trovano, pertanto, una potenziale applicazione principalmente nell'individuo sano il cui profilo molecolare può essere valutato preliminarmente per evitare prospetticamente l'assunzione di farmaci con interazioni negative.
- *Trattamento*: nell'identificazione della terapia ottimale (in termini di *effectiveness*), l'utilizzo di informazioni genomiche e di approcci computazionali per integrare i dati consentirebbe di prevedere e,

potenzialmente, ottimizzare l'effetto di una terapia su un paziente specifico caratterizzato da un profilo molecolare compatibile, determinandone la sensibilità a farmaci specifici; di fatto il profilo molecolare individuale è stato dimostrato essere, in alcuni casi, un forte predittore dei benefici di una specifica terapia. Inoltre queste informazioni possono venire utilizzate per eseguire approcci di “*Drug repositioning*” finalizzati all'identificazione di nuove indicazioni per principi attivi esistenti.

La medicina di precisione ha trovato sviluppi particolarmente efficaci e promettenti anche in ambito oncologico. I tumori sono malattie molto diffuse e sono tra le principali cause di morte in tutto il mondo e la loro incidenza è in aumento principalmente a causa dell'invecchiamento della popolazione e della diffusione di stili di vita non salutari. La ricerca scientifica ha già identificato molte delle lesioni molecolari che guidano lo sviluppo di neoplasie, mostrando che ogni tumore ha una propria firma genomica, con alcune caratteristiche specifiche e alcune caratteristiche comuni a più tipi. Questa nuova comprensione dei meccanismi oncogenici ha cominciato a influenzare la valutazione del rischio, le categorie diagnostiche e le strategie terapeutiche attraverso un crescente uso di farmaci e anticorpi destinati a contrastare l'attività e l'influenza di specifici *driver* molecolari. Diverse terapie personalizzate sono state (e vengono tutt'ora) sviluppate dimostrando un'efficacia notevole nella cura di queste patologie.

Validazione ed interpretazione delle informazioni genomiche

L'utilizzo in ambito clinico delle informazioni farmacogenomiche deve soddisfare specifici criteri riguardanti validità analitica, validità clinica e utilità clinica. La validità analitica e clinica riguardano aspetti prettamente metodologici e d'interpretazione del dato che in alcuni casi possono essere di non facile risoluzione, dipendenti principalmente dalla qualità dei dati dei test genetici e dalle caratteristiche di performance del test, quali ad esempio i valori predittivi positivi e negativi. L'utilità clinica consente di valutare se l'uso del test contribuisce ad un migliore esito della malattia nei pazienti sottoposti a test, nonché ad una valutazione dei rischi che si verificano a seguito della somministrazione del test. Diversi parametri possono essere utilizzati per stimare la validità e l'utilità clinica, inclusa la penetranza della variante genetica nella risposta al medicinale. Inoltre, i dati possono essere raccolti da studi di farmacocinetica in vivo o in vitro o da altri studi funzionali preclinici e clinici che consentono di effettuare una valutazione degli effetti farmacologici o delle concentrazioni di un farmaco rispetto alle varianti geniche individuali. Ulteriori fonti di dati utilizzabili includono casi clinici, studi di famiglie e studi clinici randomizzati che mettono a confronto risultati provenienti da fonti diverse.

Allo stato attuale non vi è un consenso sui parametri necessari a stabilire l'utilità clinica dei test basati su informazioni farmacogenomiche. Tali valutazioni richiedono l'analisi attraverso una visione sistemica ed integrata dei test farmacogenomici che tenga in considerazione non solo dell'impatto clinico ma anche il confronto con interventi sanitari alternativi, nonché la valutazione di come tali test possano influenzare il comportamento dei clinici.

Va inoltre considerato che il costo del sequenziamento diminuisce con velocità esponenziale e non sembra essere molto lontano il momento in cui ciascun individuo disporrà delle informazioni relative al proprio genoma; pertanto, se ciò dovesse verificarsi, il problema non sarà più l'ottenimento di specifiche informazioni genomiche ma lo sviluppo di un modello clinico-sanitario in grado di massimizzare l'utilizzo di queste informazioni con approcci costo-efficaci.

Implementazione clinica della farmaco genomica

Alcune varianti genomiche che influenzano gli effetti clinici di alcuni farmaci possono ora essere testate in modo affidabile per un utilizzo in ambito clinico; questo processo può significativamente influenzare l'attività prescrittiva in base agli esiti ottenuti, ad esempio determinando il sottogruppo di pazienti in cui l'effetto del farmaco è massimizzato, la dose efficace o la predizione degli eventi avversi.

La farmacogenomica può svolgere un ruolo importante nell'identificazione dei *responder* e *non responder* ai farmaci, evitando gli eventi avversi e ottimizzando la dose di farmaco da somministrare. Possono inoltre essere estrapolate informazioni sul farmaco che possono descrivere:

- l'esposizione al farmaco e la variabilità della risposta clinica
- il rischio di eventi avversi
- il dosaggio genotipo-specifico
- i meccanismi d'azione dei farmaci
- target polimorfici del farmaco

Allo stato attuale circa il 15% dei farmaci approvati dalla FDA ed EMA contengono indicazioni di tipo farmacogenomico sui foglietti illustrativi e solo un sottoinsieme di tali *biomarkers* hanno effettivamente indicazioni cliniche attuabili. Finora, solo 16 (numero in lenta ma costante crescita) dei circa 19.000 geni umani conosciuti forniscono informazioni farmacogenomiche con impatto clinico. Tuttavia, nonostante il numero di farmaci per i quali le informazioni genomiche possono fornire indicazioni cliniche sia relativamente piccolo (v. ad esempio l'elenco in Figura 1), l'attività prescrittiva potrebbe ottenere significativi vantaggi da un utilizzo più integrato dei test genetici nella pratica clinica.

Figura 1. Varianti genetiche germinali e farmaci associati

Genetic variation	Medications
<i>TPMT</i>	Mercaptopurine, thioguanine, azathioprine
<i>CYP2D6</i>	Codeine, tramadol, tricyclic antidepressants
<i>CYP2C19</i>	Tricyclic antidepressants, clopidogrel, voriconazole
<i>VKORC1</i>	Warfarin
<i>CYP2C9</i>	Warfarin, phenytoin
<i>HLA-B</i>	Allopurinol, carbamazepine, abacavir, phenytoin
<i>CFTR</i>	Ivacaftor
<i>DPYD</i>	Fluorouracil, capecitabine, tegafur
<i>G6PD</i>	Rasburicase
<i>UGT1A1</i>	Irinotecan, atazanavir
<i>SLCO1B1</i>	Simvastatin
<i>IFNL3 (IL28B)</i>	Interferon
<i>CYP3A5</i>	Tacrolimus

Le varianti genetiche specifiche dei tessuti tumorali rappresentano invece un caso speciale di variazione

somatica d'interesse farmacogenomico (v.ad esempio l'elenco in Figura 2) in grado di identificare quali tipi di tumori maligni sono in grado di rispondere alle varie terapie antitumorali.

Il test genetico per l'identificazione dei tumori maligni è diventato più preciso in risposta allo sviluppo di agenti antitumorali per il trattamento di neoplasie caratterizzate da varianti genetiche acquisite.

Esistono una serie di barriere che impediscono la diffusione dell'utilizzo di test farmacogenomici a supporto della prescrizione di farmaci. In primis l'assenza d'incentivi per i medici finalizzati alla promozione di test genetici/genomici potenzialmente in grado di limitare l'insorgenza di eventi avversi. L'esistenza di un numero ridotto di studi del rapporto costo-efficacia dei test farmacogenomici non consente una valutazione economico-sanitaria oggettiva del reale impatto di tali approcci, tantomeno in considerazione del fatto che il test potrebbe essere effettuato nei primi mesi ed utilizzato per tutto il resto della vita di un individuo. Molti sistemi sanitari non prevedono il rimborso di tali procedure e questo costituisce un ulteriore deterrente ad un utilizzo routinario di queste metodologie.

Figura 2. Varianti genetiche somatiche in cellule tumorali e farmaci associati

Genetic abnormality	HGVS nomenclature*	Target†	Medications	Disease
<i>AKT</i> mut (act)	p.Glu17Lys	mTOR	Sirolimus, everolimus	RCC
<i>BCR-ABL</i> (SV)	t(9;22)(q34.1;q11.21)	ABL	Imatinib, dasatinib	CML, Ph ⁺ ALL
<i>BCR-ABL</i> (SV, mut)	p.Val299Leu	ABL	Bosutinib, nilotinib	Imatinib-resistant CML
<i>BCR-ABL</i> (T135I)	p.Thr135Ile	ABL	Ponatinib	CML, Ph ⁺ ALL
<i>BCR-ABL</i> (SV)	t(9;22)(q34.1;q11.21)	SRC	Dasatinib	CML, Ph ⁺ ALL
<i>BRCA1/2</i> variants	Too numerous to list	PARP	Olaparib	Ovarian cancer
<i>BRAF</i> SNVs (V600E/K)	p.Val600Glu, p.Val600Lys, p.Val600Asp	BRAF	Dabrafenib, vemurafenib	Melanoma
<i>BRAF</i> SNVs (V600)	p.Val600Glu, p.Val600Lys, p.Val600Asp	MEK	Trametinib	Melanoma
<i>EGFR</i> (ex 19 del, SNV L858R)	p.Glu746_Ala750del, p.Leu858Arg	EGFR	Afatinib, erlotinib	NSCLC (EGFR ⁺)
<i>EGFR</i> mut (act, amp)	p.Glu746_Ala750del, p.Leu858Arg	EGFR	Gefitinib	NSCLC (EGFR ⁺)
<i>EGFR</i> ⁺ and WT <i>KRAS</i>	N/A	EGFR	Cetuximab, panitumumab	EGFR ⁺ colon cancer (WT <i>KRAS</i>)
<i>EML-ALK</i> (SV)	inv(2)(p21p23)	ALK	Crizotinib	NSCLC
<i>FLT3</i> CNV (amp)	p.D600_L601insFREYED, p.Asp835Tyr	FTL3	Sunitinib, sorafenib	AML
<i>HER2</i> (amp)	N/A	ERBB2	Lapatinib, trastuzumab	HER2 ⁺ breast cancer
<i>KIT</i> mut (act)	p.Trp557_Lys558del, p.Asp579del, p.Val559Asp	KIT	Imatinib, sunitinib	RCC, GIST
<i>PDGFR</i> (mut or SV)	p.Asp842Val	PDGFR	Sunitinib, imatinib	RCC, GIST, pancreatic cancer
<i>PI3K</i> (mut or amp)	PIK3CA p.Glu542Lys, p.Glu545Lys; p.His1047Arg, p.His1047Leu	PI3K	Idelalisib	CLL, NHL
<i>RARA</i> (SV, gene fusion)	t(15;17)(q24;q21)	RARA	Tretinoin, allretinoin	APL, CTCL, Kaposi sarcoma
<i>RARA</i> (SV, gene fusion)	t(15;17)(q24;q21)	RARA	Arsenic trioxide	APL
<i>SMO</i> mut (act)	p.Trp535Leu, p.Arg199Trp, p.Arg562Gln	Smoothen	Vismodegib	Basal cell carcinoma
<i>VHL</i> (mut)	Too numerous to list	VEGFR	Sorafenib	RCC, hepatic cancer, thyroid cancer
<i>VEGF</i> (mut)	N/A	VEGF	Ziv-aflibercept	Colon cancer

Inoltre, il costo e la complessità degli approcci computazionali necessari per identificare, catalogare, prioritizzare e interpretare le varianti genetiche di carattere farmacogenomico costituiscono un'ulteriore barriera alla diffusione nella pratica clinica dei test di farmacogenomica. Nonostante un numero crescente di strumenti bioinformatici per le analisi delle varianti genomiche, essi richiedono ancora un notevole livello di

competenza spesso non ancora disponibile nella gran parte delle strutture sanitarie che potrebbero beneficiarne. Di fatto, non è ancora stato definito un modello che stabilisca quali entità nella catena sanitaria debba assumersi la responsabilità dell'aggiornamento, della valutazione e del pagamento dei test genetici anche in ambito farmacogenomico.

Recentemente è stato sviluppato il concetto di genotipizzazione *pre-emptive* inteso come la profilazione molecolare degli individui sulla base di pannelli di varianti genomiche in maniera routinaria. La teoria dietro questo approccio si basa sulla possibilità che le informazioni genomiche possano essere a disposizione del medico nella cartella clinica elettronica (EMR) già al momento della prescrizione (e anche prima) in modo da effettuare decisioni razionali riguardo la scelta e/o la dose del farmaco. Si evidenzia anche una questione importante in relazione alle prove per l'implementazione clinica: non possiamo intraprendere studi clinici randomizzati e controllati o studi prospettici per ogni variante genomica che viene identificata, e altre metodologie per valutare l'utilità clinica di un *biomarker* genomico dovrà essere utilizzato.

Barriere alla diffusione ed implementazione dei test di tipo farmacogenomico

Un'ampia ed omogenea applicazione della farmacogenomica nella pratica clinica è ancora da raggiungere. I fattori che ne influenzano l'utilizzo sono costituiti da:

- Le dimensioni del mercato e il ruolo dell'industria. Nel Regno Unito ed in Germania alcune industrie farmaceutiche hanno giocato un ruolo molto attivo nell'introduzione di test di farmacogenomica (quali ad esempio HER2). Nei piccoli mercati di altri paesi europei, le aziende hanno fornito un supporto limitato e la diffusione è stata generata da pazienti e medici. Il ruolo dell'industria nel garantire che i test diagnostici di tipo molecolare siano attraenti commercialmente e possano raggiungere l'implementazione clinica è essenziale.
- Livello di utilizzo. Il livello di utilizzo varia molto tra i paesi con differenti procedure cliniche e livelli di accettazione dell'innovazione.
- Rimborso. Le pratiche cliniche sono soggette a vincoli finanziari derivanti anche dal contenimento della spesa sanitaria e da valutazioni di costo-efficacia. Di conseguenza, la disponibilità di sviluppare sistemi di rimborso per i test farmacogenomici può costituire un incentivo essenziale per l'implementazione di tecnologie diagnostiche di tipo genomico.
- Gruppi di supporto del paziente. I gruppi di supporto del paziente sono cruciali per l'integrazione di test farmacogenomici; un esempio è costituito dal ruolo attivo svolto da parte delle organizzazioni dei pazienti nell'introduzione di Herceptin/HER2.
Gruppi di pazienti possono influenzare l'integrazione dei test molecolari nella pratica clinica aumentando la consapevolezza tra i loro membri, favorendo l'*empowerment* e generando un aumento della domanda ed un conseguente uso crescente.
- Educazione e formazione. L'assenza di educazione e formazione costituisce una forte barriera all'implementazione dei test di farmacogenomica. L'istruzione convenzionale o di orientamento per i medici e altri professionisti sanitari su come interpretare i risultati dei test o anche solo sui meccanismi alla base del funzionamento è scarso. L'introduzione di tali tecnologie richiede la formazione di una vasta gamma di personale sanitario che deve essere in grado di comprendere, utilizzare ed interpretare correttamente i test supportando il paziente in ogni fase del processo.

- Aspetti sociali. Nel tempo, nella popolazione generale si è acquisita la percezione che i test farmacogenomici abbiano un impatto inferiore in termini sociali ed etici rispetto ad altre applicazioni di tipo molecolare (quali ad esempio i test predittivi per le patologie croniche e degenerative). Finora, il consenso informato per i principali test farmacogenomici (quali ad esempio l'HER2 o il test TPMT) è stato positivamente accettato dai pazienti a cui venivano sottoposto. Tuttavia, esiste una crescente preoccupazione sull'impatto etico di nuove tecnologie emergenti. In particolare, non è da escludere che futuri test farmacogenomici possano avere conseguenze per familiari di primo grado e sollevare questioni legate alla privacy e incertezze simili a quelle avvertite per altre tipologie di test genetici legate alle malattie ereditarie.
- Responsabilità legale. In ambito oncologico, laddove l'applicazione ha trovato l'utilizzo più ampio, i test farmacogenomici non hanno trovato alcun tipo di opposizione da parte dei pazienti. Tuttavia, con l'aumentare della consapevolezza e della conoscenza dei pazienti, il mancato utilizzo di queste tecnologie potrebbe costituire un pretesto per una mancanza professionale del medico. La paura di una responsabilità legale rischia di portare ad un drastico aumento della diffusione dei test farmacogenetici come forma di medicina difensiva, in previsione di contenziosi di tipo legale.
- Analisi di costi-efficacia. La valutazione oggettiva dell'impatto clinico ed economico del test potrebbe costituire un fattore molto importante per il livellamento degli ostacoli alla applicazione clinica. Tuttavia le informazioni disponibili per questo tipo di valutazione sono, al momento, limitate.
- Validità ed utilità clinica. Vi è un consenso internazionale riguardo l'opinione che le basi di evidenza dell'impatto clinico dell'applicazione di PGX siano ancora molto deboli. Per confermare la validità clinica delle associazioni genotipo-fenotipo, è necessaria una ricerca sistematica e coerente. Tuttavia, un limite a questi sviluppi è costituito dall'assenza di finanziamenti pubblici dedicati e da un interesse ancora limitato da parte dell'industria, soprattutto per lo sviluppo di applicazioni di tipo farmacogenomico per i farmaci con brevetti scaduti.

Regolamentazione delle conoscenze e dei processi dei test farmacogenomici

Lo sviluppo delle competenze farmacogenomiche presso l'EMA e l'FDA in principio è stato stimolato dagli *outcomes* scientifici derivanti dalle attività accademiche ed industriali. Ciò ha reso necessario lo sviluppo di nuove capacità ed *expertises* da parte delle agenzie regolatorie che rilasciano le autorizzazioni all'immissione in commercio (AIC) per i farmaci. L'EMA ha iniziato a focalizzarsi sulle tematiche di tipo farmacogenomico, attraverso workshop con le parti interessate per affrontare le esigenze emergenti. Nel 2002 è stato istituito un gruppo di esperti sulla farmacogenomica, il primo ad essere istituito da una agenzia regolatoria, che include esperti del mondo accademico e normativo. L'EMA ha continuato ad espandere le sue competenze per consentire una valutazione globale della diagnostica di tipo farmacogenomico nello sviluppo dei medicinali.

- *L'uso dei dati PGX nella valutazione dell'autorizzazione all'immissione in commercio (AIC) dei medicinali.* Sulla base delle informazioni acquisite dalle evidenze scientifiche allo stato attuale quasi tutti gli studi clinici in corso di grande entità includono la raccolta di dati genetici, pur non essendo richiesto ai fini dell'AIC. Le agenzie regolatorie hanno nel tempo sviluppato linee guida di supporto alle aziende per la sottomissione dei dati farmacogenomici nell'ambito della presentazione dei dossier di AIC. Rimangono tuttavia aperte le sfide riguardo la validazione dei biomarcatori e l'identificazione di percorsi condivisi per valutarne l'utilizzo nella

pratica clinica.

- Licenze di prodotti di tipo farmacogenomico: combinazioni farmaco-test o approvazione separata?

La scelta tra la concessione dell'AIC di farmaci in combinazione con test diagnostici o la separazione tra questi due processi nell'ambito della validazione clinica costituisce una sfida significativa sia per le agenzie regolatorie che per l'industria. In Europa l'EMA non ha una responsabilità primaria per l'approvazione dei test diagnostici (ancorché in ambito farmacogenomico) ed il suo mandato è limitato all'approvazione delle terapie farmacologiche.

Attualmente l'EMA può consigliare l'uso di un test diagnostico come informazione inserita nel foglio illustrativo del farmaco. Tuttavia, non è chiaro come tale procedura diagnostica possa essere recepita dagli stati membri o come questo processo possa essere regolato al di fuori del campo di applicazione della direttive di diagnostica in vitro (IVD).

- Nuove indicazioni farmaco genomiche. I dati derivanti dagli studi clinici più recenti suggeriscono che i test farmacogenomici possono migliorare significativamente la sicurezza anche dei farmaci già disponibili sul mercato. Il meccanismo giuridico che consente di inserire variazioni sul foglietto illustrativo permetterebbe di aggiungere ulteriori informazioni clinicamente rilevanti sulla base di nuovi dati emergenti e di migliorare gli *outcomes* derivanti da farmaci già in commercio.

- Regolamentazione dei test farmacogenomici in clinica. All'attuale velocità di crescita delle applicazioni cliniche di tecnologie d'interesse farmacogenomico, si rende necessario il supporto di sistemi di controllo della qualità sia di tipo laboratoristico che di gestione dei dati. Questi modelli sono già in pratica in diversi laboratori relativamente a diverse discipline scientifiche, tra cui anche i test per le malattie genetiche.

- Accreditamento e Quality Assessment dei laboratori clinici. I sistemi di accreditamento hanno lo scopo di fornire un sistema indipendente d'ispezione delle prestazioni, del personale, delle infrastrutture e dei processi del laboratorio per mantenere la qualità del servizio. Sistemi di accreditamento dei laboratori sono stati istituiti in diversi paesi europei e costituiscono un requisito volontario, spesso incoraggiato ma comunque mai forzato. Altri meccanismi includono schemi di controllo esterno della qualità finalizzati ad identificare i laboratori che sono a scarso rendimento e a fornire loro assistenza. Tali schemi sono di particolare beneficio ai piccoli paesi che a volte non hanno la "Massa critica" per lanciare un regime nazionale. Un supporto internazionale per lo sviluppo di sistemi condivisi di *Quality Assessment* internazionali potrebbe pertanto costituire una priorità importante per l'UE nel campo dei test di farmacogenomica.

Farmacogenomica nella pipeline di sviluppo dei farmaci

L'applicazione di approcci farmacogenomici nelle fasi di sviluppo dei farmaci è un processo in evoluzione che inizia con la scoperta e continua attraverso la conferma dei risultati di efficacia e sicurezza clinica. Gli studi di farmacogenomica possono contribuire a una maggiore comprensione delle differenze interindividuali nell'efficacia e la sicurezza dei farmaci a partire dalla fase di sperimentazione. Le caratteristiche molecolari di maggiore rilevanza nello sviluppo di farmaci sono quelle associate a geni in quattro grandi categorie:

- (1) i geni connessi alle caratteristiche farmacocinetiche;
- (2) i geni che codificano per bersagli farmacologici ed altri *pathway* legati alla risposta farmacologica;
- (3) i geni non direttamente correlati agli aspetti farmacologici del principio attivo ma che possono predisporre l'individuo a tossicità, ad esempio attraverso le reazioni immunitarie;
- (4) i geni che influenzano la suscettibilità della malattia o la progressione.

Tutti questi fattori genetici possono influenzare significativamente il profilo rischio-beneficio di un medicinale. I dati farmacogenomici nelle fasi preliminari di sviluppo di un farmaco possono fornire indicazioni critiche sul dosaggio del principio attivo, per la stratificazione dei pazienti nelle fasi successive, o prospettivamente sulla strategia per l'ulteriore raccolta di *biomarkers* genetici nei successivi RCT. I dati genomici possono pertanto supportare la strategia di sviluppo dei principi attivi, attraverso:

- (1) l'identificazione della variabilità dei soggetti alla risposta clinica;
- (2) la valutazione del contributo dei polimorfismi negli aspetti clinicamente significativi della farmacodinamica, farmacocinetica, efficacia o sicurezza;
- (3) la valutazione di potenziali interazioni tra farmaci;
- (4) lo studio delle basi molecolari relative ad una assenza di efficacia o di insorgenza di reazioni avverse;
- (5) la progettazione di studi clinici per la valutazione di sottogruppi specifici in cui l'effetto farmacologico risulta magnificato (*study enrichment strategies*).

Riposizionamento del Farmaco su base Farmacogenetica

Il riposizionamento del farmaco (*Drug Repositioning*) consiste nel dare un nuovo ruolo ad un farmaco che in origine era stato creato o sviluppato per altre patologie. Lo schema generale che potrebbe essere seguito nel *Drug Repositioning* richiede: il sequenziamento dell'intero esoma e trascrittoma di pazienti con una specifica patologia, l'analisi comparativa delle sequenze, l'identificazione di nuovi geni, lo studio del RNA, delle proteine e/o dei *pathways* metabolici coinvolti nello sviluppo delle malattie umane. Questo flusso di lavoro ha lo scopo di identificare *pathways* che sono implicati nell'insorgenza o sviluppo di una patologia con l'obiettivo di selezionare i *targets* più rilevanti per lo sviluppo di un farmaco. La sperimentazione di bersagli ipotetici richiede pertanto, lo sviluppo e la validazione in vitro di modelli cellulari che mimano il processo biologico o molecolare coinvolto nella malattia. La selezione dei farmaci da testare può essere condotta attraverso l'analisi della struttura 3D delle proteine bersaglio dedotta tramite approcci sperimentali o di *modelling* oppure dedotta tramite simulazione di *docking* molecolare comparato con una libreria di farmaci orfani. Lo screening iniziale dei farmaci selezionati richiede l'ottimizzazione di piattaforme con un'elevata processività e con flusso di lavoro preferibilmente automatizzato. Successivamente, i farmaci selezionati verranno sottoposti ad una validazione in vivo utilizzando modelli cellulari ed animali. Infine, saranno necessari trials clinici su pazienti con lo scopo di valutare la sicurezza e l'efficacia dei farmaci come possibili strumenti terapeutici per specifiche patologie.

Trovare un nuovo ruolo per i farmaci già approvati sta diventando un approccio molto efficace dal punto di vista farmacoeconomico. Il riposizionamento del farmaco si presenta come un percorso rapido, in quanto i dati clinici e farmacocinetici delle molecole di interesse sono stati già generati, valutati e stabiliti. Questi farmaci

pertanto, possono essere riposizionati in modo rapido richiedendo anche un minor numero di pazienti da arruolare nei trials clinici per testarne la sicurezza e l'efficacia. La conseguente riduzione dei tempi di approvazione rispetto alla scoperta di nuovi farmaci, riduce drasticamente i costi di sviluppo fornendo ai pazienti opzioni terapeutiche in tempi molto ridotti. Il *drug repositioning*, infatti, mira a migliorare l'attuale produttività dei farmaci, rispetto all'enorme impiego di tempo e costi per lo sviluppo di nuove molecole. È importante sottolineare che spesso, l'allestimento di nuovi farmaci fallisce a causa della tossicità o della mancanza di efficacia. Inoltre, il riposizionamento del farmaco risulta utile nell'ambito delle malattie rare, in quanto da una parte non è possibile reclutare un elevato numero di pazienti per i trials clinici, dall'altra i vincoli economici limitano l'interesse delle aziende farmaceutiche nella scoperta di nuove molecole terapeutiche.

Rispetto allo sviluppo di nuovi farmaci il *drug repositioning* offre:

1. la formulazione e la produzione di un flusso di lavoro già stabilito;
2. la reale conoscenza di dati sulla tossicità e la farmacocinetica;
3. la reale conoscenza sulla sicurezza e tossicità;
4. dati di post-distribuzione e di sorveglianza già disponibili.

Obiettivi e Raccomandazioni (Cap 5 a)

Da quanto esposto emergono le seguenti priorità, rispetto alle quali sono identificabili i relativi interventi (Tabella 10):

1. Promuovere un consenso sui parametri necessari a stabilire l'utilità clinica dei test basati su informazioni farmaco genomiche
2. Definire una linea guida per l'utilizzo più integrato delle valutazioni farmacogenetiche nella pratica clinica.
3. Istituire un registro dei trattamenti basati sul sequenziamento del profilo del paziente e del loro esito

Tabella 10. Interventi identificabili

Argomento: <i>Farmacogenomica</i>		
	Responsabilità operativa	Indicatori per la valutazione di processo e di output
Intervento 1: <i>Promuovere un consenso sui parametri necessari a stabilire l'utilità clinica dei test basati su informazioni farmaco genomiche</i>		
Azioni		

Definire un documento di consenso	intervento 'Centrale'	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
Intervento 2: <i>linea guida per l'utilizzo più integrato delle valutazioni farmacogenetiche nella pratica clinica</i>		
Azioni .		
<ul style="list-style-type: none"> Definire linee-guida 	intervento 'Centrale'	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> Implementare linee-guida 	intervento 'Regionale'	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N
Intervento 3: <i>costituzione di un registro dei casi di farmaco genomica</i>		
Azioni .		
<ul style="list-style-type: none"> redazione di un regolamento 	intervento 'Centrale'	Disponibilità di regolamento nazionale approvato dal Garante: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> Implementare registri regionali 	intervento 'Regionale'	Costituzione di un Registro regionale: % dei Registri regionali implementati
Nota <i>il registro è mirato a permettere valutazioni di cost-effectiveness ed è istituito ai sensi del DPCM di cui all'artt. 12, comma 11 del DL 18/10/12 n179</i>		

5.b Terapia personalizzata dei tumori

- **Genomica nel cancro della mammella.** Nel trattamento del carcinoma della mammella differenti test genetici e genomici consentono di fornire informazioni sulla prognosi e il trattamento del carcinoma della mammella. Dopo la recente pubblicazione dello studio MINDACT abbiamo la prima evidenza di tipo I in oncologia sulla capacità di un classificatore genomico (MammaPrint) di evitare l'uso della chemioterapia in una larga percentuale di donne con signature genomica a basso rischio e criteri clinicopatologici ad alto rischio. MammaPrint® è un test in vitro, basato sulla tecnologia microarray, che valuta il profilo di espressione genica della neoplasia mammaria, su campione prelevato al momento della chirurgia. Il test classifica le pazienti in due categorie: basso e alto rischio di metastasi (G-high vs G-low).

La popolazione di pazienti candidata al test, secondo le indicazioni approvate in EU, include donne operate di ca mammario, T1 o T2 (< 5cm), N0 o N+ (1-3), ER+ o ER-. Negli Stati Uniti MammaPrint è stato approvato solo per pazienti N-.

Il campione di tessuto viene inviato in RNA-later al laboratorio centralizzato di Agendia (NL): la paziente viene classificata ad "alto rischio" (29% a 10 anni, senza nessun trattamento) o "basso rischio" (10% a 10 anni, senza nessun trattamento).

I dati dello studio MINDACT forniscono la prima evidenza di livello 1° A (dati da studio clinico prospettico, randomizzato), *practice changing*, a favore dell'impiego di MammaPrint in questo sottogruppo di pazienti con carcinoma mammario operato, in quanto indicano che la chemioterapia adiuvante può essere evitata nelle pazienti classificate a basso rischio genomico.

L'obiettivo principale dello studio MINDACT era verificare se alle pazienti con cancro della mammella (LN 0-3) classificate a "basso rischio" - secondo prognosi molecolare con MammaPrint - e "alto rischio" - secondo prognosi clinica con calcolatore automatizzato Adjuvant!Online - poteva essere risparmiata la chemioterapia adiuvante dopo intervento chirurgico senza influenzare la sopravvivenza libera da metastasi a distanza. Un totale di 1550 pazienti (23.2%) dei circa 7000 reclutati erano classificati ad alto rischio clinico e a basso rischio genomico e sono stati quindi randomizzati a chemioterapia sì oppure no. A 5 anni, la sopravvivenza libera da metastasi in questo sottogruppo senza chemioterapia è stata del 94,7% (95% IC, 92.5-96.2) con una differenza di 1.5 punti percentuali in favore della chemioterapia. Di recente l'ASCO ha pubblicato le linee guida sull'utilizzo dei classificatori genomici per la prognosi dei tumori mammari dopo intervento chirurgico. Di seguito sono riportate alcune delle principali raccomandazioni (Tabella 11).

Tabella 11. Raccomandazioni ASCO sull'utilizzo dei classificatori genomici per la prognosi dei tumori mammari post intervento chirurgico

CARCINOMA MAMMARIO : ER+/HER2 - ,N0	
ONCOTYPE DX:	Score alto = HT+ CT
	Score intermedio = attendere risultati TAILORx
QUALITA' DI EVIDENZA ALTA / GRADO DI RACCOMANDAZIONE FORTE	

ENDOPREDICT: identifica pz a buona prognosi con la sola HT
QUALITA' DI EVIDENZA INTERMEDIA / GRADO DI RACCOMANDAZIONE MODERATO

PAM50: Alto rischio = HT + CT
QUALITA' DI EVIDENZA INTERMEDIA / GRADO DI RACCOMANDAZIONE MODERATO

BREAST CANCER INDEX: Identifica pz a buona prognosi con la sola HT a 5 e 10 anni
QUALITA' DI EVIDENZA INTERMEDIA / GRADO DI RACCOMANDAZIONE MODERATO

-IHC4: Dati non riproducibili, testato in un singolo centro, non ha dimostrato riproducibilità
QUALITA' DI EVIDENZA INTERMEDIA / GRADO DI RACCOMANDAZIONE MODERATA

Sono anche presi in considerazione i dati scientifici ottenuti nelle HER2 positive e nelle triplo negative, che però non sono qui riportate in quanto i classificatori prognostici comunque non sono applicabili in questi sottogruppi di pazienti.

- **Genomica nel cancro dell'ovaio.** Il cancro ovarico è un tipico esempio di malattia eterogenea. Negli ultimi anni la classificazione dei tumori ovarici è stata approfondita e ulteriormente dettagliata grazie agli studi morfologici, immunoistochimici e di genetica molecolare. Con l'avvento della NGS, si è infatti giunti alla recente scoperta che il carcinoma ovarico è in realtà costituito da un insieme complesso di diverse malattie. In sottogruppi eterogenei di pazienti sono state identificate infatti svariate alterazioni genetiche ed epigenetiche di fondamentale importanza nella genesi e progressione del tumore. Il carcinoma ovarico è ora classificato in tre grandi categorie basate sulla popolazione cellulare principale del tumore: cellule epiteliali, germinali e stromali. Il carcinoma ovarico epiteliale (EOC) rappresenta la maggior parte, circa l'85-90% di tutti i cancro ovarici. A sua volta l'EOC è classificato in 5 sottotipi: sieroso (il più frequente con 70% dei casi), endometrioidale, a cellule chiare, mucinoso, tumori di Brenner e tumori indifferenziati. Ci sono differenze sostanziali tra i sottotipi di EOC riguardo fattori di rischio su base genetica, l'oncogenesi molecolare, l'espressione di mRNA, la prognosi e la risposta ai farmaci. Esiste inoltre un modello dualistico di classificazione dell'EOC basato sui profili clinici e genetici. I tumori di tipo 1 includono i tumori sierosi a basso grado, endometrioidale, a cellule chiare, mucinoso e di Brenner. Sono caratterizzati rispettivamente da mutazioni somatiche di BRAF, KRAS, PIK3CA e PTEN e sono generalmente indolenti, confinati all'ovaio, e mostrano bassa sensibilità alla chemioterapia. I tumori di tipo 2 che comprendono invece i tumori sierosi di alto grado, endometrioidi di alto grado, i carcinosarcomi e i carcinomi indifferenziati sono, al contrario, clinicamente aggressivi e si presentano in stadio già avanzato. In questi tumori la mutazione più comune è quella di TP53 seguita dall'inattivazione somatica di BRCA1/BRCA2. TP53 codifica un fattore di trascrizione proteico (p53) che è coinvolto nella riparazione del DNA, nella regolazione del ciclo cellulare e nell'apoptosi. Le mutazioni di TP53 sono presenti in più del 95% dei carcinomi ovarici sierosi di alto grado. La perdita precoce della funzione di p53 osservata nei carcinomi sporadici potrebbe determinare la creazione di un ambiente predisponente alla perdita di funzione di BRCA1 o BRCA2 (o altri deficit nei meccanismi di riparazione

del DNA), che potrebbero condurre all'apoptosi. L'inattivazione di BRCA 1 e/o 2 è determinata nel 67% delle pazienti con HGOC che è marcatamente più alto che negli altri istotipi di EOC. Questa inattivazione è frequentemente il risultato di una ipermetilazione.

BRCA1/2 risultano inattivati nel 40-50% dei HGOC sporadici. Questa inattivazione è frequentemente il risultato di una ipermetilazione.

Pertanto, sia TP53 che BRCA 1/2 giocano un ruolo importante nella stabilità genetica e le mutazioni di questi geni sono causa di carcinogenesi.

I cancro ereditari costituiscono una piccola, ma più ampia di quanto inizialmente stimata, proporzione degli EOC. Si stima che circa il 25% di tutti gli EOC abbiano una componente ereditaria.

Le due sindromi principali associate con cancro ovarico familiare sono la sindrome ereditaria ovaio-mammella (HBOC) e la sindrome di Lynch.

L'HBOC costituisce circa l'80% dei cancro ovarici ereditari ed è tipicamente associata a mutazione dei geni BRCA. Tuttavia, più recentemente, anche mutazioni di altri geni sono risultate associate alla patogenesi di HBOC.

BRCA1 e 2 codificano per proteine che sono coinvolte nella riparazione del DNA; nello specifico, sono implicati nella ricombinazione omologa, un meccanismo molto accurato di riparazione delle rotture a doppia elica del DNA. BRCA1 ha anche la funzione aggiuntiva di regolare il ciclo cellulare.

Quando si verifica la perdita di un allele *wild-type* in un *carrier*, vengono meno i meccanismi di riparazione del DNA e ciò può determinare lo sviluppo di neoplasia mammaria/ovarica. Diversi studi hanno stimato che circa il 13-15% delle pazienti affette da carcinoma ovarico siano portatrici di mutazioni germinali di BRCA1 o BRCA2 e questa frequenza raggiunge il 17% nelle pazienti con adenocarcinoma sieroso ad alto grado.

La sindrome di Lynch è la seconda più comune causa di cancro ovarico ereditario, rappresentando circa il 10-15% di tale condizione. E' una condizione autosomica dominante caratterizzata dalla presenza di tumori del colon-retto sincroni o metacroni. E' anche associata con una maggior frequenza di altre neoplasie, tra cui quelle di endometrio, ovaio, apparato urogenitale, encefalo, rene, stomaco e vie biliari. Diversi geni che codificano per le proteine mismatchrepair (MMR) sono implicati nella sindrome di Lynch: MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. Le proteine MMR riconoscono e correggono inserzioni e delezioni e mutazioni di singole basi. Quando questi geni sono fallati o silenziati, zone di ripetizione di piccole sequenze, conosciute come microsatelliti del DNA, possono aumentare le loro dimensioni provocando instabilità nel DNA. Questa instabilità dei micro satelliti (MSI) altera geni che hanno importanti funzioni cellulari come apoptosi, segnali intracellulari e riparo del DNA, accrescendo il rischio di carcinogenesi.

Le mutazioni germinali di BRCA1 e BRCA2 sono presenti nella maggioranza delle pazienti con carcinoma ovarico ereditario, al contrario la frequenza di queste mutazioni in pazienti non selezionate è solo del 15.3%.

Il termine "*BRCAness*" è stato utilizzato per descrivere i tratti fenotipici che alcuni tumori ovarici sporadici condividono con i tumori riscontrati nelle portatrici di mutazioni germinali di BRCA1/2 e che rispecchiano le atipie molecolari ad essi correlate. Il "*BRCAness*" sembra essere il risultato di diversi

processi epigenetici. Dati recenti suggeriscono che l'ipermetilazione del promotore di BRCA1 ricorre nel 10-15% dei casi sporadici ed è associata con l'istotipo sieroso. Anche la down-regolazione di BRCA2 può avvenire tramite il silenziamento del suo regolatore FANCF attraverso la metilazione del promotore. In aggiunta alle loro implicazioni istologiche, i tumori con mutazioni di BRCA sono più facilmente platino-sensibili e associati a maggiori PFS e OS. La remissione delle mutazioni germinali di BRCA1 o BRCA2 nelle singole pazienti o la perdita della metilazione del promotore di BRCA1 predicono la resistenza al platino e potrebbero inoltre predire la resistenza ai PARP (poli-ADP-riboso polimerasi) inibitori.

Sebbene le pazienti con mutazioni BRCA1/2 e bassa espressione di proteina/mRNA di BRCA1 mostrino una risposta più favorevole al trattamento e una migliore prognosi, la metilazione promotrice di BRCA1 è significativamente correlata a resistenza al trattamento e a prognosi peggiore. Dunque, la metilazione non è funzionalmente equivalente a una mutazione germinale nel mediare la sensibilità alla chemioterapia.

Mentre la metilazione di BRCA1 è più frequente nel cancro ovarico sporadico, non è stata riportata nella forma ereditaria della malattia o in campioni derivanti da donne con mutazioni germinali di BRCA1. BRCA2 non presenta un profilo di metilazione simile nel cancro ovarico.

La scoperta di un biomarcatore che abbia le sensibilità e specificità necessarie per l'individuazione del cancro ovarico a stadi precoci è ancora argomento dibattuto e, pertanto, sono ancora in corso di studio molteplici combinazioni di biomarcatori. I *biomarkers* possono essere utilizzati a diversi scopi: diagnostici, per la diagnosi precoce di malattia, che possono essere utilizzati principalmente anche per programmi di screening; prognostici, usati per predire la progressione di malattia; marcatori di recidiva, impiegati per monitorare la risposta a un dato trattamento.

Il CA 125 è ad oggi il più studiato e utile marcatore nei carcinoma ovarici sieroso ed endometrioidi. È una glicoproteina naturalmente secreta dall'epitelio celomatico mulleriano e dagli epitelii di molti organi. Esso viene espresso in situazioni patologiche benigne sia ginecologiche che addominali, così come in altri tumori maligni. Il CA 125 è aumentato in circa il 70-90% delle donne con malattia in stadio avanzato, ma solo nel 50-60% negli stadi precoci. A causa della bassa prevalenza del cancro ovarico nella popolazione, il valore predittivo positivo del CA125 è solo del 4%.

Alla luce di questi parametri, non è indicato l'utilizzo nella pratica clinica del CA 125 da solo per lo screening iniziale dell'EOC. Al contrario, è approvato l'impiego del CA125 come test di monitoraggio della risposta nella rilevazione di malattia residua o recidivata nelle pazienti dopo la terapia di prima linea. Poiché variazioni del CA125 sono correlate alla prognosi della malattia, è stata avanzata la proposta da uno studio recente che una sorveglianza seriata del CA 125 possa identificare le pazienti destinate a una chirurgia citoreducente secondaria. Ad oggi, più di 30 marcatori sono stati valutati da soli o in combinazione con il CA 125, come ad esempio HE4, mesotelina, osteopontina, prostasina, EGFR ecc. HE4 è una glicoproteina che si trova naturalmente negli epitelii dei sistemi riproduttivi e respiratorio. È stato dimostrato che tale proteina è overespressa nei tumori endometrioidi (100%), sierosi (93%) e a cellule chiare (50%), ma non nei tumori mucinosi. Se paragonato al CA 125, HE4 mostra una maggiore specificità nelle donne in premenopausa e nelle patologie benigne ed ha una maggiore sensibilità nei tumori a stadi precoci. Inoltre, è overespressa nel 32% dei casi in cui il CA125

non è aumentato. Attualmente, HE4 è utilizzato principalmente per il monitoraggio della recidiva o progressione di cancro ovarico epiteliale.

Dalla revisione della letteratura, ci sono discrepanze nei risultati dalla combinazione di CA 125 con HE4. Comunque, l'indice ROMA, che deriva dalla combinazione dei livelli sierici di CA 125, HE4 e stato menopausale è stato validato come metodo per distinguere le masse benigne dai tumori maligni. Per le donne con rischio riconosciuto di cancro ovarico ereditario, ad esempio nei casi di mutazione familiare di BRCA, è suggerita fortemente l'ovariosalpingectomia bilaterale profilattica, con o senza isterectomia, per ridurre il rischio di sviluppare il tumore.

L'approccio migliore per le donne che rifiutano la chirurgia non è ancora chiaro, ma sono in corso studi volti a valutare se ci sia un vantaggio dal monitoraggio stretto di queste pazienti attraverso il controllo routinario del CA 125 e l'esecuzione di ecografie annuali. Il rapido sviluppo della genetica e dell'epigenetica ha facilitato lo studio dei meccanismi molecolari alla base del carcinoma ovarico. Questa conoscenza ha condotto all'introduzione di nuovi trattamenti indirizzati verso fattori molecolari bersaglio-specifici implicati nella crescita del tumore. L'individuazione degli eventi molecolari che controllano questo tumore può migliorare la nostra comprensione della tumorigenesi e costruire strategie di trattamento individualizzate per questa malattia letale.

L'angiogenesi quale bersaglio terapeutico nelle patologie tumorali ginecologiche è stata ampiamente indagata. Il Bevacizumab, un anticorpo monoclonale diretto contro il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF-A) è l'agente antiangiogenetico più studiato nell'EOC. In aggiunta al trattamento di prima linea, in associazione alla chemioterapia standard con carboplatino e paclitaxel è stato approvato a seguito di due grandi studi, il GOG 218 e l'ICON 7. Entrambi gli studi hanno valutato la concomitanza di chemioterapia e bevacizumab seguiti da un mantenimento con bevacizumab per una durata totale di trattamento di 15 (GOG 218) o 12 (ICON – 7) mesi. Nonostante le differenze nel disegno degli studi, entrambi hanno mostrato un miglioramento significativo nella progression free survival (PFS) (GOG-218: HR = 0.72; p < 0.001; ICON-7: HR = 0.81; p < 0.004).

E' in atto uno sforzo maggiore di ricerca volto ad identificare biomarcatori predittivi che possano aiutare ad individuare quelle pazienti che possano trarre il maggior beneficio da questo trattamento. Sono state descritte differenze nell'efficacia del bevacizumab tra i sottotipi molecolari di HGSOE, suggerendo il sottotipo mesenchimale come il sottogruppo che ottiene il più grande beneficio dal bevacizumab, con un miglioramento del PFS di 9.5 mesi. Il bevacizumab in combinazione con la chemioterapia standard ha anche dimostrato un miglioramento nella PFS nella malattia platino-sensibile negli studi OCEANS e GOG 213 e nella malattia platino resistente (Studio AURELIA) nell'ambito della malattia ricorrente. Come detto, la disfunzione di BRCA1 e BRCA2 è associata alla tumorigenesi del carcinoma ovarico, dovuta alla incapacità di riparare le rotture a doppia elica del DNA (DSBs). I PARPs sono una famiglia di enzimi coinvolti nella riparazione dell'escissione di base, un *pathway* chiave nella riparazione delle rotture a singola elica del DNA. L'inibizione di PARP conduce alla persistenza di rotture spontanee a singola elica e conseguentemente alla formazione di rotture a doppia elica. Queste non possono essere riparate nelle cellule con BRCA mutato, per cui determinano la morte cellulare. Gli inibitori di PARP inducono la morte dei tessuti con deficit di BRCA. I carcinomi in cui è presente un deficit di BRCA1-2 sono ora riconosciuti come il bersaglio di una classe di farmaci detti PARP inibitori. La deficienza di PARP o BRCA non hanno impatto singolarmente, ma l'assenza di entrambe conduce ad un effetto letale.

Lo studio clinico dell'uso di PARP inibitori per il trattamento dell'EOC ha avuto una rapida evoluzione dall'osservazione dell'attività dei singoli agenti condotta in vitro in cellule tumori BRCA-deficienti nel 2005 fino all'inizio di studi di fase 3 nel 2013. L'analisi retrospettiva di dati derivanti da uno studio di fase 2 randomizzato in doppio cieco ha dimostrato che i pazienti con carcinoma ovarico sieroso recidivato, platino sensibile, con una mutazione BRCA, mostrano il maggiore beneficio dal trattamento con olaparib, il primo PARP inibitore umano. Due studi di fase 3 hanno testato olaparib verso placebo come trattamento di mantenimento sia per i tumori ovarici di nuova diagnosi che per quelli recidivati associati a mutazione di BRCA. Nel dicembre 2014 olaparib è stato approvato per il trattamento di pazienti con carcinoma ovarico avanzato associato a mutazione germinale BRCA1/2 che hanno ricevuto tre o più linee di chemioterapia. Questa approvazione rappresenta la prima terapia personalizzata per il cancro ovarico. Altri PARP inibitori che sono stati testati o sono in corso di studio includono veliparib, niraparib, rucaparib e BMN673.

Vi sono prospettive future per una migliore precisione della terapia individualizzata, come ad esempio la valutazione dell'impiego dei PARP-inibitori nella malattia platino-resistente nelle pazienti con particolari aberrazioni molecolari o dell'immunoterapia.

Inoltre vi sono evidenze che il recettore progesteronico (PR) ed estrogenico (ER) mediano la proliferazione e l'apoptosi delle cellule del carcinoma ovarico. Studi precedenti hanno mostrato che l'espressione di PR ed ER sono associate con un miglioramento della sopravvivenza indipendente dai fattori prognostici clinici, ma queste associazioni non hanno ancora trovato una conferma radicata in termini clinici. Sono pertanto necessarie ulteriori indagini sull'uso della terapia endocrina nel carcinoma ovarico: se somministrata a pazienti selezionate, positive per ER e in particolare per PR, la terapia endocrina potrebbe essere un'opzione percorribile per il trattamento del carcinoma ovarico. Considerando inoltre il loro profilo di sicurezza, il basso costo e la già dimostrata modesta efficacia nel setting della malattia recidivata, gli inibitori dell'aromatasi potrebbero essere un'opzione terapeutica per il carcinoma ovarico anche in aggiunta alla terapia standard di prima linea, ma il loro utilizzo in questo setting non è ancora stato esplorato.

- **Genomica nel cancro del polmone.** Negli ultimi anni ci sono stati significativi progressi nella comprensione di biologia e trattamento del tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC). Diverse terapie a bersaglio molecolare sono in uso o in via di sviluppo. Le neoplasie polmonari sono tradizionalmente classificate in base a istologia e caratteristiche di immunistochimica; ma diverse mutazioni somatiche possono essere identificate nei diversi sottotipi istologici. Per stratificare i pazienti oggi è impiegata la combinazione di caratteristiche isto-morfologiche, immunistochimiche e genetiche. E' ormai procedura standard, per gli adenocarcinomi, l'analisi di *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) e di *Anaplastic Lymphoma Kinase* (ALK). Alcune istituzioni analizzano routinariamente anche ROS, RET, BRAF e HER2 che però non hanno ancora una terapia target validata.

Adenocarcinoma. E' una delle neoplasie epiteliali meglio caratterizzate geneticamente. L'identificazione di mutazioni di EGFR e il riarrangiamento di ALK hanno portato a cambiare l'algoritmo terapeutico e a specifiche terapie molecolari. La necessità dei test molecolari per valutare EGFR emerge dalla riconosciuta sensibilità agli inibitori tirosinocinasi di EGFR (TKi) come gefitinib, erlotinib, afatinib, che rappresentano oggi la prima linea di terapia nel NSCLC con mutazione di

EGFR. La mutazione viene riscontrata nel 10-15% dei pazienti caucasici ed è più frequente nelle donne e nei non fumatori. La maggior parte di queste neoplasie inizialmente rispondono alla terapia, con un tasso di risposta del 60-75%, ma successivamente sviluppano resistenza; mediamente dopo 9-12 mesi. Recentemente è stato dimostrato che, in circa il 50% dei pazienti, il meccanismo di resistenza si instaura per la comparsa di una nuova mutazione in EGFR (T790M) per cui sono in corso studi con TKi di III generazione (AZD9291 e CO-1686) che sembrano riportare un tasso di risposta di circa 60%.

Altri meccanismi di resistenza sono stati definiti con re-biopsia del tessuto tumorale. Per alcuni di questi meccanismi sono in corso di valutazione studi con nuovi farmaci target.

Nel 1-10% degli adenocarcinomi viene identificato il riarrangiamento del gene ALK (ALK fusion, EML4-ALK), ROS e RET. I pazienti con traslocazione di ALK, o riarrangiamento di ROS1 sono candidati a terapia con crizotinib e altri TKis. Crizotinib è un inibitore tirosino-chinasi multi target di ALK, ROS, e MET. Viene riportato un tasso di risposta tra il 50 e il 61% e tempo mediano alla progressione tra i 9 e i 11 mesi. In modo analogo alla terapia con inibitori di EGFR, anche queste terapie vanno incontro a resistenza. Ceritinib (LDK 378) ha dimostrato un alto tasso di risposta nei pazienti ALK positivi e non trattati con crizotinib, sembra più potente e selettivo di crizotinib e sono in corso studi sui pazienti già trattati e resistenti a crizotinib.

Alcune delle più frequenti alterazioni genomiche nell'adenocarcinoma, come le mutazioni in TP53, KRAS e STK11 non hanno una corrispondente terapia target efficace. Il complesso MAPK è spesso implicato nello sviluppo di adenocarcinomi polmonari e il meccanismo più frequente è la mutazione attivante di KRAS, osservata in circa il 20-25% degli adenocarcinomi. Recentemente uno studio di fase II con selumetinib (inibitore di MEK) ha mostrato una promettente attività nei pazienti KRAS mutati.

Neoplasie a istologia squamosa: Negli ultimi anni ci sono stati pochi progressi nelle terapie target del carcinoma squamoso. L'amplificazione genica del *Fibroblast Growth Factor Receptor 1* (FGFR1) è presente nel 7-25% dei tumori squamosi e sono in via di sviluppo terapie target.

Microcitoma: Le neoplasie polmonari a piccole cellule (SCLC) rimangono neoplasie molto aggressive con opzioni terapeutiche limitate. Questo tipo di neoplasie hanno un alto tasso di mutazioni, soprattutto secondarie ai carcinogeni del tabacco, e questo rende difficile l'identificazione di mutazioni "driver" rilevanti dal punto di vista terapeutico.

- **Genomica nel cancro del colon retto.** Nel trattamento del carcinoma del colon-retto differenti test genetici e molecolari consentono di fornire informazioni sulla prognosi e il trattamento del carcinoma del colon-retto:

Test di espressione genica, ONCOTYPE DX e COLOPRINT, hanno dimostrato di calcolare con precisione il rischio di recidiva da carcinoma del colon-retto operato in stadio II-III. Allo stato attuale tali test non hanno una validazione per quanto riguarda il ruolo predittivo dell'efficacia della chemioterapia adiuvante somministrata dopo la chirurgia. Queste analisi di espressione genica hanno

esclusivamente un ruolo prognostico ma non predittivo di efficacia della chemioterapia e pertanto la loro utilità nella pratica clinica rimane limitata.

L'instabilità dei microsatelliti (MSI) costituisce al contrario dei test di espressione genica un valido strumento di predizione di risposta alla chemioterapia nel carcinoma del colon-retto operato in stadio II. Circa il 20% dei carcinomi del colon retto presentano mutazioni o metilazioni di geni coinvolti nel riparo del danno al DNA, meccanismo chiamato MMR (MisMatch-Repair), coinvolgendo i geni MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EpCAM. I carcinomi del colon-retto che sono difettivi per il MMR (dMMR, MSI-H) sono comuni soprattutto nei carcinomi del colon-retto in stadio II. Questa caratteristica conferisce a questi tumori una prognosi favorevole rispetto ai tumori senza dMMR ma nessun beneficio dalla somministrazione di chemioterapia adiuvante contenente fluoropirimidine. Al contrario i tumori con MSI-L (bassa instabilità dei microsatelliti) o MSS (stabilità dei microsatelliti) ricevono beneficio in termini di riduzione del rischio di recidiva con la chemioterapia somministrata dopo la chirurgia.

Altri due geni vengono utilizzati nella pratica clinica per la scelta del trattamento del carcinoma del colon-retto metastatico. *Il sequenziamento dei geni RAS e BRAF* fornisce informazioni prognostiche e predittive la risposta al trattamento farmacologico.

RAS è un trasduttore del segnale intracellulare coinvolto nella cascata di segnale che porta alla crescita, proliferazione, sopravvivenza cellulare. Nel 50% dei carcinomi del colon-retto tale proteina è mutata. L'evento mutazionale di RAS rende il tumore più aggressivo e quindi a prognosi peggiore ma soprattutto costituisce fattore predittivo di resistenza a nuovi farmaci a bersaglio molecolare, ovvero gli anticorpi monoclonali anti-EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*, il fattore di crescita dell'epidermide umano) Panitumumab e Cetuximab. Al contrario i carcinomi del colon-retto che presentano RAS non mutato ottengono dalla somministrazione di tali farmaci un beneficio importante in sopravvivenza globale in qualsiasi linea di terapia nel trattamento del carcinoma del colon-retto metastatico, in associazione alla chemioterapia oppure in monoterapia senza chemioterapia.

La mutazione di BRAF costituisce un particolare evento che interessa non più del 10% dei carcinomi del colon-retto. Tale mutazione è più frequente nei carcinomi del colon destro e conferisce un comportamento molto aggressivo al tumore con una sopravvivenza attesa mediana di circa 12 mesi dalla diagnosi di malattia metastatica. E' quindi un fattore prognostico estremamente sfavorevole ma non predittivo validato di risposta alla chemioterapia. Tuttavia recenti dati hanno dimostrato che il trattamento aggressivo di questo sottotipo molecolare di carcinoma coloretale con una tripletta di chemioterapici (Fluorouracile, Oxaliplatino, Irinotecan) associato all'anticorpo monoclonale anti-VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) Bevacizumab può fornire un beneficio in sopravvivenza globale.

La biopsia liquida in oncologia

È noto come spesso le patologie tumorali siano dovute a mutazioni genetiche e come l'analisi di queste mutazioni tumore-correlate venga frequentemente utilizzata a scopo diagnostico, prognostico e terapeutico. Il profilo genetico dei tumori solidi, che attualmente viene effettuato principalmente sui tessuti prelevati dal tumore stesso tramite biopsia o intervento chirurgico, spesso è difficile da ottenere. Queste procedure hanno alcune limitazioni: in primo luogo, a causa della loro invasività, non possono essere svolte routinariamente. Un

secondo limite è rappresentato da un bias di selezione del campione: infatti, una biopsia fornisce una fotografia limitata del tumore, nel sito del prelievo e nel momento del prelievo, e potrebbe non contenere tutti i sub-cloni tumorali. Poiché le cellule tumorali apoptotiche o in necrosi liberano frammenti di DNA nel torrente ematico, e questo DNA correla con lo stadio del tumore e con la prognosi, la biopsia liquida può rappresentare invece una fonte di DNA ottimale, in grado di offrire le medesime informazioni del DNA tissutale, comprendendo il profilo genetico sia della lesione primaria, sia delle metastasi. In un primo tempo questa tecnica è stata limitata dal fatto che il DNA circolante non fosse unicamente di origine tumorale e quindi l'identificazione di alleli tumorali fosse complessa: con il miglioramento della sensibilità e dell'accuratezza delle tecniche di sequenziamento, anche la biopsia liquida si è perfezionata e ha reso possibile l'individuazione delle aberrazioni genetiche ed epigenetiche. La biopsia liquida attualmente offre un elevato grado di specificità: questo significa che è in grado di fornire dati robusti e riproducibili in modo semplice e non invasivo.

Studi recenti sul carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) hanno valutato lo stato mutazionale di EGFR, da cui emergono, nel confronto tra DNA circolante e DNA tissutale, una concordanza del 93%, una specificità del 99% e una sensibilità del 65%. Potrebbe essere utilizzata per una varietà di applicazioni cliniche e sperimentali precedentemente impossibili: il monitoraggio di una serie di genotipi tumorali, che sono instabili e, sotto pressione selettiva, soggetti a cambiamenti, sta diventando sempre più plausibile.

La biopsia liquida, inoltre, potrebbe fornire nuove intuizioni biologiche nel processo di metastasi e chiarire vie di segnalazione coinvolte nei processi di invasività cellulare e nella capacità di dare metastasi.

La biopsia liquida può trovare grande utilità anche nella *target therapy*: consente per esempio il monitoraggio della presenza di cloni di resistenza ai farmaci, come nel caso della terapia anti-EGFR.

Ulteriori potenziali applicazioni della biopsia liquida potrebbero essere lo screening precoce delle neoplasie maligne e la diagnosi della malattia minima residua. Infine, la biopsia liquida può divenire fondamentale come biomarker non invasivo per lo sviluppo di strategie di gestione del tumore personalizzato sul singolo paziente.

Obiettivi e Raccomandazioni (Cap 5 b)

Da quanto esposto emergono le seguenti priorità, rispetto alle quali sono identificabili i relativi interventi (Tabella 12):

- **Promuovere nella pratica clinica l'uso appropriato della genomica nella valutazione della prognosi e nella terapia dei tumori.** Poiché negli ultimi anni ci sono stati significativi progressi nella comprensione di biologia e trattamento dei tumori della mammella, dell'ovaio, del polmone, e del colon-retto è necessario che l'uso clinico di tali conoscenze sia promosso ed appropriato, sostenuto da chiare indicazioni *evidence-based*. È quindi necessario prevedere sia un'accurata valutazione di utilizzabilità clinica sia un suo tempestivo aggiornamento in base alle evidenze scientifiche prodotte; ciò è conseguibile mediante la produzione di linee-guida con una funzione di *quick-review* periodica della letteratura sia primaria che secondaria; tale funzione dovrebbe essere assicurata dal *network HTA* previsto nel Cap. 6.

Tabella 12. Interventi identificabili

Argomento: test genomici nella valutazione della prognosi e nella terapia dei tumori		
	Responsabilità operativa	Indicatori per la valutazione di processo e di output
Intervento 1: <i>produrre linee guida per l'uso appropriato della genomica nella valutazione della prognosi e nella terapia dei tumori (mammella, ovaio, polmone, colon-retto)</i>		
<ul style="list-style-type: none"> Definire linee-guida 	intervento 'Centrale'	Disponibilità di linee-guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> Implementare linee-guida 	intervento 'Regionale'	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N

Bibliografia

- Collins FS, Varmus H. A New Initiative on Precision Medicine. *N Engl J Med.* 2015;372(9):793-795.
- Snyder A et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 2014; 371:2189-99.
- Lamb, J. et al(2006). The Connectivity Map : Using. *Science*, 313, 1929–1935.
- Grosse, S. D. & Khoury, M. J. What is the clinical utility of genetic testing? *Genet. Med.* 8, 448–450 (2006).
- Relling, M. V., & Evans, W. E. Pharmacogenomics in the clinic. *Nature*, 526(7573), 343–50. 2015
- Clinical Pharmacogenomics: Premarket Evaluation in Early-Phase Clinical Studies and Recommendations for Labeling. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM337169.pdf>
- Cardoso F, et al: 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(8):717-29)
- Harris LN, et al.. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol.* 2016; 34(10):1134-50
- Schaner ME, Ross DT, Ciaravino G, Sorlie T, Troyanskaya O, Diehn M, et al. Gene expression patterns in ovarian carcinomas. *Molecular Biology of the Cell.* 2003; 14:4376–4386.

10. Chao SY, Chiang JH, Huang AM, et al. An integrative approach to identifying cancer chemoresistance-associated pathways *BMC Med Genomics*. 2011; 4: 23.
11. Kobel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, et al. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Medicine*. 2008; 5(12):e232.].
12. Singer G, Kurman RJ, Chang HW, Cho SK, Shih le M. Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. *American Journal of Pathology*. 2002; 160(4):1223–1228
13. Kurman RJ, Shih le M. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer—shifting the paradigm. *Human Pathology*. 2011; 42(7):918–931.
14. Bell D, Berchuck A, Birrer M, Chien J, Cramer D, Dao F, et al. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011; 474(7353):609–615].
15. Katabathina VS, Prasad SR. Genetics of Susceptibility to Sporadic Ovarian Cancer, in eLS. John Wiley & Sons, Ltd., 2013
16. Mayr D, Kanitz V, Anderegg B, et al. Analysis of gene amplification and prognostic markers in ovarian cancer using comparative genomic hybridization for microarrays and immunohistochemical analysis for tissue microarrays. *Am J ClinPathol*. 2006; 126: 101–9]
17. Patch AM, Christie EL, Etemadmoghadam D, et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer. *Nature*. 2015; 521: 489–94]
18. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*. 2002; 108: 171–82
19. Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, et al. 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: 134–47].
20. Weissman SM, Weiss SM, Newlin AC. Genetic testing by cancer site: ovary. *Cancer J* 2012;18:320–7.
21. Al Bakir M, Gabra H. The molecular genetics of hereditary and sporadic ovarian cancer: implications for the future. *Br Med Bull*. 2014 Dec;112:57-69
22. Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* 2012;12:68–78.
23. Pal T, Permuth-Wey J, Betts JA, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer* 2005;104:2807–16.
24. Lynch HT, Casey MJ, Snyder CL, et al. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol Oncol* 2009;3:97–137.
25. Backes FJ, Cohn DE. Lynch syndrome. *Clin Obstet Gynecol* 2011;54:199–214.
26. Iacopetta B, Grieu F, Amanuel B. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol* 2010;6: 260–9.
27. Frank TS, Manley SA, Olopade OI, et al. Sequence analysis of BRCA1 and BRCA2: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 2417–25.
28. Rigakos G, Razis E. BRCAness: finding the Achilles heel in ovarian cancer. *Oncologist*. 2012; 17: 956–62.
29. Yang HJ, Liu VW, Wang Y, et al. Differential DNA methylation profiles in gynecological cancers and correlation with clinicopathological data. *BMC Cancer*. 2006; 6:212.
30. Wiley A, Katsaros D, Chen H, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in malignant ovarian tumors and in ovarian tumors with low malignant potential. *Cancer*. 2006; 107: 299–308

31. Taniguchi T, Tischkowitz M, Ameziane N, et al. Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nat Med.* 2003; 9: 568–74.
32. Lim SL, Smith P, Syed N, et al. Promoter hypermethylation of FANCF and outcome in advanced ovarian cancer. *Br J Cancer.* 2008; 98: 1452–6.
33. Vencken PM, Kriege M, Hoogwerf D, et al. Chemosensitivity and outcome of BRCA1- and BRCA2-associated ovarian cancer patients after first-line chemotherapy compared with sporadic ovarian cancer patients. *Ann Oncol.* 2011; 22: 1346–52.
34. Sun C, Li N, Ding D, et al. The role of BRCA status on the prognosis of patients with epithelial ovarian cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *PLoS ONE.* 2014; 9: e95285
35. Norquist B, Wurz KA, Pennil CC, et al. Secondary somatic mutations restoring BRCA1/2 predict chemotherapy resistance in hereditary ovarian carcinomas. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 3008–15.
36. Sakai W, Swisher EM, Karlan BY, et al. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature.* 2008; 451: 1116–20.]
37. Bol GM, Suijkerbuijk KP, Bart J, et al. Methylation profiles of hereditary and sporadic ovarian cancer. *Histopathology.* 2010;57: 363–70.
38. Kontorovich T, Cohen Y, Nir U, et al. Promoter methylation patterns of ATM, ATR, BRCA1, BRCA2 and p53 as putative cancer risk modifiers in Jewish BRCA1/BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; 116: 195–200
39. Elzek MA, Rodland KD. Proteomics of ovarian cancer: functional insights and clinical applications. *Cancer Metastasis Rev.* 2015;34:83-96
40. Cohen JG, White M, Cruz A, Farias-Eisner R. In 2014, can we do better than CA125 in the early detection of ovarian cancer? *World Journal of Biological Chemistry.* 2014; 5(3):286–300.
41. Yin BW, Lloyd KO. Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16. *Journal of Biological Chemistry.* 2001; 276(29):27371–27375.46, 47
42. Bast RC Jr, Urban N, Shridhar V, Smith D, Zhang Z, Skates S, et al. Early detection of ovarian cancer: promise and reality. *Cancer Treatment and Research.* 2002; 107:61–97.
43. Fleming ND, Cass I, Walsh CS, Karlan BY, Li AJ. CA125 surveillance increases optimal resectability at secondary cytoreductive surgery for recurrent epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology.* 2011; 121(2):249–252
44. Bast RC Jr, Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, et al. New tumor markers: CA125 and beyond. *International Journal of Gynecological Cancer.* 2005; 15(Suppl 3):274–281
45. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, Mok SC, Crum CP, Welch WR, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Research.* 2005; 65(6):2162–2169.
46. Hellstrom I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, Ledbetter JA, Schummer M, McIntosh M, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Research.* 2003; 63(13):3695–3700
47. Moore RG, Miller MC, Steinhoff MM, Skates SJ, Lu KH, Lambert-Messerlian G, et al. Serum HE4 levels are less frequently elevated than CA125 in women with benign gynecologic disorders. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2012; 206(4):e351–358.
48. Montagnana M, Danese E, Giudici S, Franchi M, Guidi GC, Plebani M, et al. HE4 in ovarian cancer: from discovery to clinical application. *Advances in Clinical Chemistry.* 2011; 55:1–20.

49. Moore RG, Miller MC, Disilvestro P, Landrum LM, Gajewski W, Ball JJ, et al. Evaluation of the diagnostic accuracy of the risk of ovarian malignancy algorithm in women with a pelvic mass. *Obstetrics and Gynecology*. 2011; 118(2 Pt 1):280–288
50. Escudero JM, Auge JM, Filella X, Torne A, Pahisa J, Molina R. Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases. *Clinical Chemistry*. 2011; 57(11):1534–1544
51. Van Gorp T, Cadron I, Despierre E, Daemen A, Leunen K, Amant F, et al. HE4 and CA125 as a diagnostic test in ovarian cancer: prospective validation of the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm. *British Journal of Cancer*. 2011; 104(5):863–870.
52. Montagnana M, Danese E, Ruzzenente O, Bresciani V, Nuzzo T, Gelati M, et al. The ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) for estimating the risk of epithelial ovarian cancer in women presenting with pelvic mass: is it really useful? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2011; 49(3):521–525.
53. Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, DiSilvestro P, Miller MC, Allard WJ, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *GynecologicOncology*. 2009; 112(1):40–46
54. Long KC, Kauff ND. Hereditary ovarian cancer: recent molecular insights and their impact on screening strategies. *CurrOpinOncol* 2011;23:526–30.
55. Bai H, Cao D, Yang J, Li M, Zhang Z, Shen K, Genetic and epigenetic heterogeneity of epithelial ovarian cancer and the clinical implications for molecular targeted therapy. *J Cell MolMed*. 2016;20:581-93
56. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2011;365:2473–2483. • Key study supporting bevacizumab for first-line therapy in EOC.
57. Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, et al. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2011;365:2484–2496. • Key study supporting bevacizumab for first-line therapy in EOC]
58. Liu J, Westin SN, Rational selection of biomarker driven therapies for gynecologic cancers: The more we know, the more we know we don't know. *GynecolOncol*. 2016;141:65-71
59. Winterhoff BJN, Kommoss S, Oberg AL, et al. Bevacizumab and improvement of progression-free survival (PFS) for patients with the mesenchymal molecular subtype of ovarian cancer. *J ClinOncol*. 2014;32:5s. (suppl; abstr 5509
60. Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, et al. OCEANS: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *J ClinOncol*. 2012;30(17):2039–2045. • Randomized phase III trial that led for the approval of bevacizumab in EOC treatment.
61. Coleman RL, Brady B MF, Herzog TJ, et al. A phase III randomized controlled clinical trial of carboplatin and paclitaxel alone or in combination with bevacizumab followed by bevacizumab and secondary cytoreductive surgery in platinum-sensitive, recurrent ovarian, peritoneal primary and fallopian tube cancer (Gynecologic Oncology Group 0213). Presented at: Society of Gynecologic Oncology's Annual Meeting on Women's Cancer 2015; 2015 Mar 28–31; Chicago, IL. Abstract 3
62. Pujade-Lauraine E, Hilpert F, Weber B, et al. Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer: the AURELIA open-label randomized phase III trial. *J ClinOncol*.

2014;32(13):1302–1308. • Randomized phase III trial that led for the approval of bevacizumab in EOC treatment

63. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 2004; 95: 866–71.
64. Safra T, Borgato L, Nicoletto MO, et al. BRCA mutation status and determinant of outcome in women with recurrent epithelial ovarian cancer treated with pegylated liposomal doxorubicin. *Mol Cancer Ther.* 2011;10: 2000–7.
65. Murai J, Huang SY, Das BB, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res.* 2012; 72: 5588–99.]
66. 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 randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014; 15: 852–61
67. Ledermann J, Harter P, Gourley C, et al. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2012; 366: 1382–92 The keystone of trials supporting the efficacy of PARP inhibitor in platinum-sensitive EOC
68. Liu JF, Konstantinopoulos PA, Matulonis UA. PARP inhibitors in ovarian cancer: current status and future promise. *GynecolOncol.* 2014; 133: 362–9
69. Walsh CS. Two decades beyond BRCA1/2: homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy. *GynecolOncol.* 2015; 137: 343–5
70. Rodriguez-Freixinos V, Mackay HJ, Karakasis K, Oza AM. Current and emerging treatment options in the management of advanced ovarian cancer. *Expert OpinPharmacother.* 2016, 16:1-14.
71. Sieh W et al. Hormone-receptor expression and ovarian cancer survival: an Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *Lancet Oncol.* 2013 Aug;14(9):853-62
72. Simpkins F et al. New insights on the role of hormonal therapy in ovarian cancer. *Steroids.* 2013 Jun;78(6):530-7
73. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature.* 2013; 499:214–218.
74. Morgensztern D., Meghan J., Campo J. et al. Molecularly targeted therapies in non-small-cell lung cancer annual update 2014. *J ThoracOncol.* 2015 January; 1-105.
75. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine.* 2004; 350:2129–2139
76. Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004; 101:13306–13311.
77. Mano H. Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer. *Cancer science.* 2008; 99:2349–2355
78. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *The New England journal of medicine.* 2009; 361:947–957
79. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2010; 11:121–128

80. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Science translational medicine*. 2011; 3:75ra26.
81. Zhou W, Ercan D, Chen L, et al. Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M. *Nature*. 2009; 462:1070–1074.
82. Network T. *Nature*. 2014
83. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2013; 368:2385–2394
84. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2010; 363:1693–1703
85. Pfizer, I., editor. XALKORI [package insert]. New York, NY: 2013.
86. Janne PA, Shaw AT, Pereira JR, et al. Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *The lancetoncology*. 2013; 14:38–47
87. Esposito A, Bardelli A, Criscitiello C, et al Monitoring tumor-derived cell-free DNA in patients with solid tumors: clinical perspectives and research opportunities. *Cancer Treat Rev*. 2014; 40(5):648-55.
88. Tie J, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*. 2016;8(346):346ra92

CAPITOLO 6

Funzione di governo centrale e azioni di supporto alla implementazione del Piano

Le azioni centrali di supporto definiscono gli impegni / i compiti che il livello di governo centrale assume per supportare la implementazione del Piano. Essi:

- si basano sull'Intesa Stato Regioni 13/3/2013 e sul DM 13/2/16 (Documento di indirizzo per l'attuazione delle linee di supporto centrali al piano nazionale della prevenzione 2014-2018)
- tengono direttamente conto degli impegni derivanti dagli atti della Comunità Europea (*Council Conclusion* - sia per quanto attiene al contesto nazionale sia per quanto attiene alla collaborazione comunitaria).

Le azioni centrali sono attuative di due obiettivi generali:

1. stabilizzazione della governance
2. gestione dell'innovazione.

Obiettivo 1: Stabilizzazione della governance

Tale obiettivo esprime la necessità di un aggiornamento e adeguamento della struttura di *governance* sui temi delle scienze omiche che deriva da atti precedenti. Essa, ovviamente, articola e specifica, ma non si sostituisce alla struttura di *governance* del sistema sanitario.

Nella tabella 13 sono ricapitolate le azioni di *governance* previste dall'Intesa 13/3/13 con la specificazione delle correlate raccomandazioni delle *Council Conclusion* del 2015. L'insieme degli elementi che ne risultano contribuiscono alla definizione di un modello di *governance* (Figura 3).

Tabella 13. Sintesi delle AZIONI PRIORITARIE DI SISTEMA e dei prodotti programmati dall'Intesa del 13/3/13 recante Linee di indirizzo su "La Genomica in Sanità Pubblica secondo il *conceptual framework* della Stewardship. Corrispondenza con le raccomandazioni agli Stati membri delle *Council Conclusion* del 7/12/15

Funzioni della <i>governance</i>	AZIONI	Raccomandazioni delle <i>Council Conclusion</i>
1. <i>Definire la policy e l'assetto di sistema</i>	1.1 stabilire regole e criteri per integrare la genomica nella sanità pubblica, sulla base di precise valutazioni di efficacia e di costo/beneficio	
	1.2 Stimolare e promuovere la ricerca di base e applicata nel campo della genomica, all'interno della rete degli IRCCS e di altri enti di ricerca sanitaria	16
	1.3 Aumentare l'impatto delle campagne informative per gli utenti e per gli operatori	17

Tabella 13. Sintesi delle AZIONI PRIORITARIE DI SISTEMA e dei prodotti programmati dall'Intesa del 13/3/13 recante Linee di indirizzo su "La Genomica in Sanità Pubblica" secondo il *conceptual framework* della Stewardship. Corrispondenza con le raccomandazioni agli Stati membri delle Council Conclusion del 7/12/15

2. <i>Esercitare influenza sugli interlocutori (azioni di indirizzo)</i>	2.1 Raccolta e diffusione delle prove di efficacia e di costo/beneficio per le principali tecnologie nel campo della prevenzione e della farmaco genomica	
	2.2 Indirizzi per la ricerca nel campo della genomica, all'interno dei programmi di ricerca pubblica	16
	2.3 Valutazione dell'immissione nei LEA di tecnologie di GSP che abbiano favorevoli risultati di efficacia e di costo/beneficio	
	2.4 Definizione di requisiti di qualificazione per la rete di laboratori di riferimento	
3. <i>Garantire la realizzazione delle politiche (strumenti per realizzare la programmazione)</i>	3.1 Definire l'assetto istituzionale, scientifico e organizzativo di sistema per la governance della genomica nella sanità pubblica	15
	3.2 Strumenti di valutazione delle tecnologie genomiche per la prescrizione appropriata di test genetici	22
	3.3 Stesura di linee guida sui percorsi clinico-assistenziali	
	3.4 Comunicazione istituzionale, anche mediante un canale web dedicato, dei risultati validati attraverso modalità idonee, dirette agli operatori e ai cittadini	18, 24
4. <i>Stabilire e mantenere collaborazioni e partnership</i>	4.1 Rete istituzionale tra Ministero della Salute, Regioni, AGENAS e Istituto Superiore di Sanità	
	4.2 Reti e partnership con le associazioni dei professionisti e dei pazienti	15, 21
5. <i>Garantire la responsabilità (accountability, responsabilizzare gli operatori)</i>	5.1 Indicazioni per gli operatori pubblici e accreditati alla prescrizione appropriata dei test	19
	5.2 Piano di comunicazione con il cittadino	18
	5.3 <i>Empowerment</i> del cittadino	15
6. <i>Gestione basata sulla conoscenza</i>	6.1 <i>Survey</i> dedicata alla conoscenza della situazione esistente, da condursi attraverso le Regioni	22
	Attivazione di un flusso di dati correnti funzionale alla valutazione dell'uso di tecnologie basate sulla genomica nell'ambito del sistema sanitario nazionale	20, 21

La struttura di governance prevede i seguenti attori:

- a) Tavolo genomica del Consiglio Superiore di Sanità
- b) Coordinamento interistituzionale

- c) Istituto Superiore di Sanità-Hub tecnico-scientifico
- d) Stakeholder Forum
- e) GENISAP
- f) Coordinamento inter-regionale
- g) Coordinamento intra-regionale

Nello specifico:

a) Tavolo genomica del Consiglio Superiore di Sanità

b) Coordinamento interistituzionale

- è previsto dall'Intesa (Azione 3.1 Definire l' assetto istituzionale, scientifico e organizzativo di sistema per la governance della genomica nella sanità pubblica e Azioni 4.1) e recepisce il Mandato 15 delle Council Conclusion (...by developing patient-centred policies...).
- È composto dalle Direzioni Generali Prevenzione, programmazione, Farmaci del Ministero, dall'ISS, dall'AGENAS, dall'AIFA, e da rappresentanti delle Regioni.
- Articola il suo lavoro con tavoli tematici tra i quali il Tavolo permanente per l'aggiornamento del prontuario (in accordo con la programmazione operativa della DG Programmazione)

c) Istituto Superiore di Sanità-Hub tecnico-scientifico

- Il ruolo dell'ISS è previsto dalle Azioni 3.1 e 4.1 dell'Intesa 2013 ("l'ISS ha il compito di condurre studi valutativi sull'efficacia, il rischio, il rapporto costo/benefici della genomica in sanità pubblica; produce report di HTA").
- Svolge le sue funzioni anche costituendo un network (hub&spoke) di centri scientifici esperti di HTA e un network (*hub & spoke*) di biobanche
- È responsabile della definizione/contestualizzazione delle linee-guida

d) Stakeholder Forum.

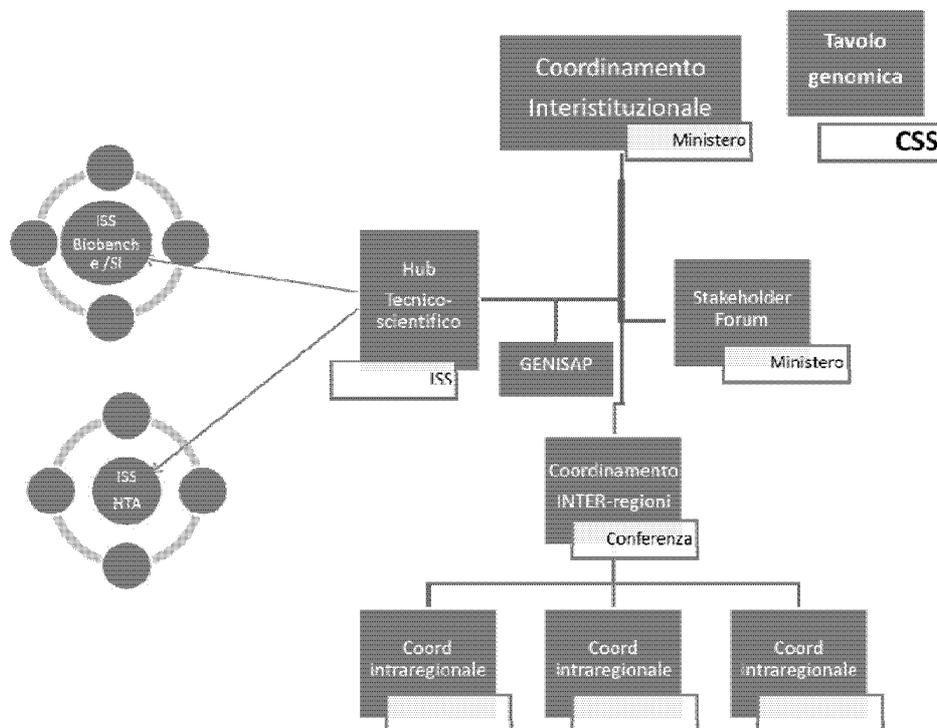
- Il Forum è una sede funzionale permanente (complessiva e/o articolata per componenti) di confronto con Associazioni di pazienti e/o cittadini, società scientifiche, attori del mondo della produzione.
- Esso risponde all'Intesa (Azione 4.2 Reti e partnership con le associazioni dei professionisti e dei pazienti) che definisce la formalizzazione di partnership come funzionale alla condivisione dei principi ai quali le rispettive attività devono conformarsi e alla individuazione di obiettivi comuni. Inoltre risponde ai Mandati 15 (...including, as appropriate, patient empowerment and the integration of patient perspectives in the development of regulation processes, in cooperation with patient organisations and other relevant stakeholders) e 21 (Promote cross-disciplinary interaction...) delle Council Conclusion.

e) **GENISAP**. In accordo con quanto stabilito nell'Intesa del 13/3/13 (Azione 4.2), GENISAP si caratterizza per la sua natura di risorsa per l'intero sistema in quanto soggetto multidisciplinare, esperto nel "trasferimento delle conoscenze e tecnologie basate sul genoma nella sanità pubblica".

f) **Coordinamento interregionale**. Analogamente a quanto accade per la prevenzione, un coordinamento inter-regionale (generato da coordinamenti intra-regionali), appare funzionale a specializzare le competenze e a favorire decisioni nelle sedi istituzionali (Conferenza Stato-Regioni)

g) **Coordinamento intra-regionale**

Figura 3. Descrizione grafica della struttura di *Governance*



Obiettivo 2: Gestione dell'innovazione

L'innovazione è da considerare la dimensione più pertinente alla funzione di governo applicata ai risultati delle scienze omiche: da una lato, quindi, si tratta di comprenderne appieno l'importanza e le implicazioni, dall'altra si tratta di identificare strumenti e 'meccanismi' che ne gestiscano l'uso in modo proattivo e sistematico.

- Importanza dell'innovazione. Le innovazioni culturali, scientifiche tecnologiche ed erogative già in qualche modo acquisite dalla ricerca nelle scienze omiche dovranno essere integrate all'interno del SSN promuovendo, al contempo, le necessarie innovazioni congeniali alle caratteristiche di questo

campo. D'altro canto, lo sviluppo della genomica (e delle scienze 'omiche' in generale) non comporta solo conseguenze sul piano della salute e della medicina. Bisogna infatti considerare che per sua stessa natura la genomica contribuisce alla (e si alimenta della) innovazione della IT, tanto che è considerata componente e "funzione" dei BIG Data.

Una fondamentale questione riguarda, inoltre, la necessità di assicurare al nostro Paese una dimensione di "innovazione continua"; in questo senso si deve riconoscere il legame specifico che lo sviluppo delle scienze omiche ha con la crescita economica. Pertanto, si tratta di attivare una capacità sistemica di "Ricerca e sviluppo" che garantisca tale prospettiva di crescita.

Queste finalità di ampio respiro necessitano di una specifica e sistematica attività di ricerca ma anche di un assetto di governo che ne guidi il raggiungimento e di un meccanismo adattativo della pianificazione. Rimandando al successivo Cap. 7 le indicazioni per la ricerca, sono di seguito affrontati i restanti due aspetti.

- Meccanismi per l'innovazione. Lo scenario è quello di un rapido sviluppo delle conoscenze legato alle scienze omiche e quindi di una forte continua pressione per l'inserimento di tale *knowledge* nella pratica del sistema sanitario. Questa prospettiva virtuosa deve essere 'governata'. L'assetto stabilizzato di una idonea capacità di HTA e di valutazione ELSI costituisce quindi un *asset* indispensabile del sistema Paese. La prospettiva, definita nella prima parte di questo capitolo, di una struttura di network con Hub nell'ISS è intesa a garantire disponibilità di risorse tecniche adeguate (strutture in networking: università, Enti centrali di ricerca, strutture qualificate del SSN) e di flessibilità tecnico-scientifica (ISS).

Tuttavia è contemporaneamente presente la necessità di una parallela e sincrona capacità di innovazione nel *policy-making*. Questa funzione è espletata dal coordinamento inter-istituzionale in una relazione generale di tipo bi-univoco (nel senso di essere 'interrogati' dalle nuove conoscenze ma anche di richiederne di mancanti per un adeguato *policy-making*) con i produttori di *knowledge* specifico.

Si distinguono quindi, da parte del coordinamento interistituzionale, due step principali:

- ✓ verifica e valutazione delle nuove conoscenze solide
- ✓ avvio nei canali decisionali istituzionali (conferenza Stato-Regioni, tavolo per l'adeguamento del prontuario, AIFA ecc) come integrazioni al presente atto di pianificazione - che comunque andrà rivisto sistematicamente a fine quinquennio.

Gli strumenti 'istruttori' del Coordinamento, ai fini del processo di innovazione continua, sono:

- ✓ conferenza periodica sull'innovazione basata sulla genomica
- ✓ attivazione di progetti-pilota o di fattibilità

Lo scenario già ricordato di rapido sviluppo è verosimile determini un ulteriore 'fronte di innovazione' che riguarda la legislazione/normazione. Fin d'ora sono emergenti alcune tematiche principali che interrelano questo atto di pianificazione ai valori, agli assetti e alle *policy* del sistema-Paese più in generale; senza ambizioni di esaustività vanno ricordati i temi:

- *sul versante sociale:* della stigmatizzazione e discriminazione, della privacy, delle ripercussioni sulla famiglia

- *sul versante delle biobanche e delle informazioni connesse:* della tutela della proprietà, degli standard di consenso; degli standard di gestione e sicurezza delle biobanche; della garanzie sulla comunicazione ecc.

In definitiva, è da considerare che sviluppi e le innovazioni scientifici e tecnologici, nonché l'evolversi stesso della consapevolezza sociale, comportino nuove esigenze di innovazione legislativa e/o normativa. Il Coordinamento, quindi, deve provvedere al sistematico rilievo di tali esigenze e alla conseguente predisposizione di proposte di atti formali.

Bibliografia

1. CDC url http://www.cdc.gov/genomics/gtesting/file/print/FBR/CF_Elsi.pdf

CAPITOLO 7

Indicazioni per la ricerca e l'innovazione.

Introduzione

Le attività di ricerca biomedica e sanitaria e di innovazione tecnologica per la salute costituiscono, al pari dell'attività assistenziale con la quale si integrano, elementi intrinseci e fondanti di ogni moderno sistema sanitario. Esse rappresentano un vero e proprio investimento per incrementare la salute dei cittadini, con la primaria conseguenza di migliorarne le aspettative e la qualità di vita. Gli investimenti nella ricerca biomedica e nell'innovazione determinano uno sviluppo non solo nel settore della sanità, contribuendo all'aumento della salute e del benessere della popolazione, ma rappresentano anche un poderoso motore di sviluppo economico. E' ormai chiaro che per affrontare le sfide economiche del futuro non ci si può affidare a prodotti a basso contenuto tecnologico, ma occorre invece creare un'economia della conoscenza basata sul valore aggiunto della ricerca avanzata.

In questa prospettiva va contestualizzata la necessità di accettare ed implementare il nuovo paradigma delle scienze omiche, che dovrebbe fondarsi sui seguenti pilastri: la personalizzazione dell'assistenza sanitaria; l'adozione di nuove tecnologie, accanto a quelle genomiche, allo scopo di incrementare la conoscenza degli individui, del loro stato di salute e di malattia, includendo in particolare nuove tecnologie biomediche e digitali come l'*imaging* ed i *sensori wireless*; lo sviluppo e l'integrazione di una prevenzione personalizzata, come approccio complementare alle classiche pratiche esistenti in sanità pubblica; l'uso della connettività mobile e delle crescenti capacità "computazionali" al fine di generare grandi quantità di dati da utilizzare per il progresso della sanità e di altri settori. Questo nuovo approccio supera esplicitamente quello della genomica classica, e unisce quelli che possono apparire campi totalmente distanti tra loro, al fine di fornire un approccio più olistico alla tutela e cura della salute.

La diffusione delle scienze omiche è stata resa possibile principalmente grazie allo sviluppo di tecniche di indagine *high-throughput* in grado di generare enormi quantitativi di dati. Ciò ha prodotto una forte richiesta di supporto dal settore dell'informatica avanzata e del calcolo ad alte prestazioni di fatto determinando la nascita e lo sviluppo della bioinformatica, disciplina che integra le competenze nell'ambito della biologia e dell'ICT. Accanto agli straordinari progressi della biologia molecolare, l'informatica e le tecniche di analisi dati stanno contribuendo in maniera significativa a decretare il successo delle nuove piattaforme e l'acquisizione di importanti progressi scientifici in questi settori. Questa relazione sostanzia la interconnessione che esiste tra sviluppo del sistema sanitario e sviluppo del sistema Paese.

Una traiettoria di ricerca e sviluppo che riguarda in modo specifico questa interconnessione è relativa al Big-Data. Come ricordato, per sua stessa natura la genomica contribuisce alla (e si alimenta della) innovazione della IT, tanto che è considerata componente e "funzione" del BIG Data .

In questo contesto di sviluppo delle scienze omiche, emergono come opportunità di Ricerca e Innovazione a valenza sistemica altre necessità, quali quella: di una maggiore armonizzazione e standardizzazione nelle metodiche di generazione ed analisi dei dati; dell'implementazione di nuovi strumenti di *data mining*, che gli attori interessati si mettano in rete per garantire maggiore efficienza e possibilità di aggiornamento nell'uso delle tecnologie, e dell'uso del materiale biologico su cui queste analisi vengono eseguite (biobanche); di

produrre sui test evidenze non solo di efficacia clinica ma anche di costo-efficacia mediante specifiche metodologie di HTA; di sviluppare politiche innovative sul costo dei farmaci ‘innovativi’; di assicurare al nostro Paese una dimensione di “innovazione continua”.

Visione Prospettica

I sistemi sanitari di tutto il mondo stanno affrontando una fase cruciale e delicata, caratterizzata da un'elevata pressione finanziaria che rischia di minarne la sostenibilità. Per affrontare la sfida di questo scenario in evoluzione, essi dovranno gestire tre nodi cruciali: ridare centralità al cittadino nel contesto del sistema; dare maggiore enfasi alle attività di prevenzione; riorganizzare radicalmente il servizio spostando le cure dall'ospedale al territorio.

L'impatto potenziale delle scienze omiche sui servizi sanitari ha portato a definire una riflessione centrata sulle opportunità che le scienze omiche forniscono e che tende a “Promuovere (incisivamente) l'innovazione”. Ciò ha comportato l'individuazione, anche in termini di *policy*, di prospettive di sviluppo che tendono a sottolineare la relazione biunivoca tra sistema sanitario e sistema Paese, soprattutto per quanto riguarda la ricerca, lo sviluppo di nuove tecnologie e l'innovazione del servizio sanitario.

Quindi, la visione è quella di governare la transizione (rivoluzione) della medicina personalizzata basata sulle scienze omiche, cogliendo e promuovendo le opportunità di innovazione e crescita di valore che essa comporta; un'attività di governo del sistema che si situa nello spazio cartesiano definito dai tre assi: innovazione, *capacity building*, sostenibilità.

Questa visione porta a identificare prospettive di sviluppo prioritarie, ulteriori e diverse almeno da quelle che riguardano lo sviluppo del ‘core’ dei contenuti scientifici. Pertanto il presente capitolo non affronta (perché pertinenti ad altre linee di pianificazione):

- lo sviluppo della conoscenza (“*knowledge*”), attesa e prevista dal potenziamento della ricerca di base e traslazionale,
- lo sviluppo della infrastruttura per il trasferimento dei dati (banda larga ecc).

In definitiva, l'identificazione delle prospettive di sviluppo, declinate alla luce delle *policy* europea e nazionale già ricordate (Cap 1), riguarda la costruzione delle capacità di governo e gestione dell'innovazione legata alle scienze omiche nonché la promozione di ambiti virtuosi di sostenibilità.

Strategie e Obiettivi

Topic I: Big data e medicina “computazionale”

La prima strategia di sviluppo è collegata alle opportunità offerte dai Big Data che possono promuovere l'efficacia e l'efficienza del sistema sanitario, nel contempo supportandone la capacità di gestire le sfide che si presentano a condizione che se ne assicuri il governo e l'utilizzazione nella pratica, in primo luogo del sistema sanitario. I Big Data stanno diventando una risorsa importante che può portare a nuove conoscenze,

creazione di valore, promozione di nuovi prodotti, processi e mercati¹. Questa tendenza è definita come "innovazione *data-driven-DDI*" e secondo l'OCSE è una fonte di crescita economica. Lo sviluppo di metodologie innovative ha già permesso una rilevante velocizzazione delle modalità attraverso cui queste informazioni trovano riscontro nella pratica clinica. Tuttavia, considerando l'enorme insieme di dati disponibili e la loro natura (*available data*), è evidente l'esigenza di concentrarsi operativamente sulla loro fruibilità (*accessible + usable data*).

In questo contesto un rilievo particolare è assunto dalle biobanche (biobanche di campioni biologici "di malattia"; biobanche di popolazione; biobanche di cellule e tessuti d'archivio per la ricerca; biobanche a indirizzo terapeutico). Queste raccolte di campioni biologici necessitano di una ottimizzazione "di sistema" e il loro utilizzo all'interno di una prospettiva di governo del sistema.

Relativamente all'aspetto della fruibilità delle informazioni che si rendano disponibili, è necessario strutturare un'organizzazione, funzioni e processi che rendano velocemente fruibili ai decisori e agli operatori sanitari le valutazioni sulle tecnologie genomiche già disponibili, contestualizzandole alle specifiche caratteristiche strutturali e di *performance* del sistema sanitario italiano. A tali scopi sono disponibili i risultati dei progetti promossi e finanziati dal Ministero della Salute, attraverso il Centro per la prevenzione ed il Controllo delle Malattie (CCM) e relativi all'analisi sia dei modelli di valutazione - HTA delle revisioni sistematiche delle evidenze scientifiche disponibili -, sia degli aspetti specifici della situazione italiana (uso delle tecnologie, percorsi diagnostico-terapeutici, etc.). Un'ulteriore declinazione della fruibilità riguarda l'utilizzo del Big data nella pratica clinica. Si tratta del tema del "*cognitive computing*" (Watson IBM®) le cui potenzialità operative vanno ricomprese in una strategia generale di innovazione.

Data per acquisita la disponibilità di una efficiente, flessibile infrastruttura di sistema (*e-health*), occorrerà sviluppare un nucleo di azioni che promuovano la creazione e l'uso di successo delle informazioni (connesse con l'assistenza).

¹ Le imprese di Internet sono state in prima linea per lo sviluppo e l'utilizzo di tecniche e tecnologie per l'elaborazione e l'analisi di grandi volumi di dati. Il modello di business di molte di queste aziende si basa molto sull'utilizzo di dati e analisi che costituiscono una delle principali fonti di enorme produttività delle imprese. Tra le aziende ICT top 250 OCSE, le aziende Internet hanno generato in media quasi un milione di dollari di ricavi per dipendente nel 2011, mentre le altre top imprese ICT hanno generato in media tra 500 USD 000 (aziende di software) per 000 USD 200 (servizi IT alle imprese).

Al di là delle aziende Internet, il resto del settore ICT ha ormai riconosciuto il Big Data come una nuova opportunità di business. Alcune stime suggeriscono che il mercato globale per la grande tecnologia e per i servizi in questo campo crescerà da 3 miliardi di dollari nel 2010 a 17 miliardi nel 2015. Per rafforzare le loro posizioni, le migliori aziende ICT stanno sempre di più acquisendo giovani start-up specializzate nei dati, analisi e servizi. Ma stanno anche collaborando con i potenziali concorrenti (co-opetition).

Per molte aziende non ICT lo sfruttamento dei dati ha già creato un significativo valore aggiunto, in una serie di operazioni, che vanno dalla ottimizzazione della catena del valore e della produzione manifatturiera ad un uso più efficiente del lavoro, migliori relazioni con i clienti, e lo sviluppo di nuovi mercati. Nel complesso, gli studi empirici suggeriscono un effetto positivo rispetto all'uso di dati e analisi di circa 5% al 10% sulla crescita della produttività.

Tuttavia, secondo l'OCSE, i settori in cui l'utilizzo del Big data potrebbe avere il più alto impatto nel breve periodo sono la pubblica amministrazione e i servizi educativi e sanitari.

Ciò è possibile attraverso una pianificazione strategica, la definizione di una struttura di governance (v. Cap 6) e della relativa *leadership* per la gestione del Big Data, l'identificazione degli interessi connessi e dei principali *stakeholder*, il loro coinvolgimento nel processo di pianificazione.

Altrettanto fondamentale sarà la costruzione di un sistema di valutazione dei "silos" di dati esistenti e delle tassonomie dei loro contenuti, delle pratiche di gestione dei dati e dell'idoneità per fini di analisi e l'interoperabilità, nonché dei progressi compiuti nella digitalizzazione del flusso di lavoro per l'assistenza sanitaria.

La *governance* dei dati dovrà tener conto della necessità di costruire la fiducia del pubblico, attraverso lo sviluppo di regolamenti e politiche per proteggere la *privacy* e la sicurezza dei dati e promuovere la trasparenza e la condivisione delle informazioni con il pubblico e con le principali parti interessate, anche attraverso adeguati piani di comunicazione.

Per quanto riguarda le infrastrutture e le capacità tecnologiche dovrà essere verificata ed eventualmente sviluppata la disponibilità di strumenti per costruire e mantenere l'architettura delle informazioni, compresi gli standard dei contenuti, gli standard di interoperabilità e la valutazione della qualità dei dati, (con un'attenzione specifica alle biobanche di popolazione) incrementando e formando il personale necessario per la gestione delle informazioni.

In quest'ottica sarà necessario sviluppare strategie di apprendimento sia per gli esperti di dati, non competenti in ambito di assistenza sanitaria, sia per gli attori del sistema sanitario

Gli obiettivi che derivano da questa strategia (v. anche Cap 6 – *assetti di governance*) sono:

- Conseguire un'autonoma (non autarchica) capacità di collezionare questi dati ed integrarli, generando informazioni di impatto preventivo e clinico
- Implementare un sistema di analisi e diffusione delle evidenze disponibili (HTA dedicato)
- Rendere fruibili le informazioni che si rendano disponibili per il loro potenziale utilizzo nel contesto del Servizio Sanitario Nazionale
- Promuovere un adeguamento del quadro di norme e regole per l'utilizzo dei dati, la loro interoperabilità e il *data sharing* internazionale
- Potenziare e rendere disponibile biobanche di popolazione (Network di)
- Potenziare la formazione universitaria in bioinformatica
- Implementare il *Cognitive computing*

Bibliografia

1. DELSA/HEA(2015)1 Organisation de Coopération et de Développement Économiques/Organisation for Economic Co-operation and Development - 03 Jun 2015 - Directorate For Employment, Labour And Social Affairs Health Committee: Why and how countries can promote the use of health care BIG DATA?
2. Floridi L The 4th Revolution Oxford University Press 2014

Topic II: Tecnologie per la *literacy*

All'interno del tema generale del "*capacity building*" assume un rilievo autonomo quello della *literacy* sia dell'intera popolazione che dei professionisti sanitari. Aumentare la *literacy* della popolazione è una vera e propria sfida che si pone al Paese. La sua importanza è facilmente comprensibile quando si guarda alla portata della 'rivoluzione omica' e alle interazioni strettissime con la cultura delle ICT. L'acquisto diretto via Internet di test per sequenziare il proprio DNA - con le incognite e possibilmente pericolose conseguenze sulla gestione delle informazioni e sul possibile uso a 'cascata' delle prestazioni del SSN - è solo una spia di come possa strutturarsi un comportamento di massa critico per gli aspetti etici e professionali e potenzialmente esplosivo sul piano della sostenibilità del SSN.

Aumentare la *literacy* è oggetto di una specifica raccomandazione delle *Council Conclusions* (la 18a). La sua importanza deriva innanzitutto dal fatto che la praticamente nulla conoscenza del significato, della potenzialità e della utilizzabilità delle scienze omiche rende l'immediato futuro cruciale per l'*imprinting* dell'uso di tali scienze e per stimolare, quindi, una cultura del loro uso appropriato. D'altra parte la profonda interconnessione con Internet - generale per l'avanzamento della IT nella nostra società, ma anche decisamente specifica per le scienze omiche - rende i processi cognitivi e di orientamento del mercato, cruciali nell'immediato e molto veloci.

La raccomandazione a promuovere la *literacy* è affiancata, nelle *Council Conclusions*, dalla raccomandazione sull'uso della comunicazione (17a) e sul *training* dei professionisti sanitari. Si delinea così una strategia complessiva che contribuisce a rendere il sistema Paese capace di gestire la rivoluzione omica.

La strategia è quella di definire e rendere disponibile un grande progetto culturale che generi, in un approccio proattivo, una capacità di *copying* (nella filosofia dell'*empowerment*) da parte della popolazione. Esso dovrà essere articolato in modi differenti, ma coordinati, per la popolazione generale, i pazienti e i professionisti.

Pertanto, dovranno essere attuate azioni che:

- rendano facilmente e rapidamente fruibili le informazioni sull'uso 'appropriato' delle omics ai medici di prossimità, cioè a quei sanitari non specialisti (MMG o altre specializzazioni) che possano svolgere una funzione di 'agenti del sistema sanitario' nella interazione diretta coi pazienti/cittadini;
- siano capaci di 'agire' nel sistema Internet al fine di intercettare e interagire con dinamiche di possibile inappropriata gestione o gestione pericolosa delle informazioni omiche e dei prodotti (in particolare i *test direct to consumers*) disponibili in rete;
- permettano un approccio parallelo ma integrato alla formazione dei professionisti sanitari, sia curricolare che continua (FAD per i professionisti).

Gli obiettivi che derivano da questa strategia sono:

- Utilizzo del web per funzioni di governo (*accountability, open-government*)
- Uso dei social per la *literacy* mediante sistemi di "*watching & counseling*"
- Realizzare un sistema di *app* per i professionisti di prossimità

Bibliografia

1. Borry P, Cornel MC, Howard HC. Where are you going, where have you been: a recent history of the direct-to-consumer genetic testing market. *J Community Genet.* 2010 Sep;1(3):101-106
2. Shehata J, Kooijman E, Ianuale C. Ethical implications and legislative control of direct-to-consumer genetic testing in Europe. *IJPH* 2012; 9:12–14.
3. Mavroidopoulou V, Xera E, Mollaki V. Awareness, attitudes and perspectives of direct-to-consumer genetic testing in Greece: a survey of potential consumers. *J Hum Genet.* 2015; 60, 515-523
4. Agurs-Collins T, Ferrer R, Ottenbacher A, Waters EA, Mary E. O'Connell,1 and Jada G. Hamilton Public Awareness of Direct-to-Consumer Genetic Tests: Findings from the 2013 U.S. Health Information National Trends Survey. *J Cancer Educ.* 2015 ; 30(4): 799–807
5. Covolo L, Rubinelli S, Ceretti E, Gelatti U. Internet-Based Direct-to-Consumer Genetic Testing: A Systematic Review. *J Med Internet Res* 2015;17(12):e279
6. Hogarth S, Javitt G, Melzer D. The current landscape for direct-to-consumer genetic testing: legal, ethical, and policy issues. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008; 9:161–182.

Topic III: Opportunità per la sostenibilità di sistema mediante il riposizionamento dei farmaci

La sostenibilità del sistema sanitario è una sfida complessiva all'interno della quale un sottoinsieme specifico riguarda la farmacogenomica. Benché questa componente sia stata per lo più, e correttamente, vista (per il generalmente alto costo dei farmaci 'innovativi') come potenzialmente destabilizzante della sostenibilità, ne esiste un ambito che, viceversa, è foriero di risparmi sia finanziari che di Sistema: il "riposizionamento dei farmaci", che postula una strategia di sviluppo industriale ma anche regolatoria.

Il riposizionamento del farmaco - *Drug Repositioning* - consiste nel dare un nuovo ruolo ad un farmaco che in origine era stato creato o sviluppato per altre patologie. Lo schema generale che potrebbe essere seguito nel *Drug Repositioning* richiede: il sequenziamento dell'intero esoma e trascrittoma di pazienti con una specifica patologia, l'analisi comparativa delle sequenze, l'identificazione di nuovi geni, lo studio del RNA, delle proteine e/o dei *pathways* metabolici coinvolti nello sviluppo delle malattie umane. Questo flusso di lavoro ha lo scopo di identificare *pathways* che sono implicati nell'insorgenza o sviluppo di una patologia con l'obiettivo di selezionare i target più rilevanti per lo sviluppo di un farmaco. La sperimentazione di bersagli ipotetici richiede pertanto, lo sviluppo e la validazione in vitro di modelli cellulari che mimano il processo biologico o molecolare coinvolto nella malattia. La selezione dei farmaci da testare può essere condotta attraverso l'analisi della struttura 3D delle proteine bersaglio dedotta tramite approcci sperimentali o di *modelling* oppure dedotta tramite simulazione di *docking* molecolare comparato con una libreria di farmaci orfani. Lo screening iniziale dei farmaci selezionati richiede l'ottimizzazione di piattaforme con un'elevata processività e con flusso di lavoro preferibilmente automatizzato. Successivamente, i farmaci selezionati verranno sottoposti ad una validazione in vivo utilizzando modelli cellulari ed animali. Infine, saranno necessari trials clinici su pazienti con lo scopo di valutare la sicurezza e l'efficacia dei farmaci come possibili strumenti terapeutici per specifiche patologie.

Trovare un nuovo ruolo per i farmaci già approvati sta diventando un approccio molto efficace dal punto di vista farmaco-economico. Il riposizionamento del farmaco si presenta come un percorso rapido, in quanto i dati

clinici e farmacocinetici delle molecole di interesse sono stati già generati, valutati e stabiliti. Questi farmaci pertanto, possono essere riposizionati in modo rapido richiedendo anche un minor numero di pazienti da arruolare nei trials clinici per testarne la sicurezza e l'efficacia. La conseguente riduzione dei tempi di approvazione rispetto alla scoperta di nuovi farmaci, riduce drasticamente i costi di sviluppo fornendo ai pazienti opzioni terapeutiche in tempi molto ridotti. Il *drug repositioning*, infatti, mira a migliorare l'attuale produttività dei farmaci, rispetto all'enorme impiego di tempo e costi per lo sviluppo di nuove molecole. È importante sottolineare che spesso, l'allestimento di nuovi farmaci fallisce a causa della tossicità o della mancanza di efficacia. Inoltre, il riposizionamento del farmaco risulta utile nell'ambito delle malattie rare, in quanto da una parte non è possibile reclutare un elevato numero di pazienti per i trials clinici, dall'altra i vincoli economici limitano l'interesse delle aziende farmaceutiche nella scoperta di nuove molecole terapeutiche.

Rispetto alla scoperta di nuovi farmaci il *drug repositioning* offre:

1. la formulazione e la produzione di un flusso di lavoro già stabilito;
2. la reale conoscenza di dati sulla tossicità e la farmacocinetica;
3. la reale conoscenza sulla sicurezza e tossicità;
4. dati di post-distribuzione e di sorveglianza già disponibili.

L'analisi per il riposizionamento dei farmaci ha il potenziale di divenire di routine per ogni nuovo farmaco e bersaglio terapeutico scoperti, con conseguente individuazione più efficiente di terapie per il *targeting* di aberrazioni molecolari specifiche.

Dato il gran numero di bersagli proteici indagabili e dei farmaci esistenti, è praticamente impossibile impostare metodi per testare ogni interazione in laboratorio. Viceversa sono stati pubblicati negli ultimi anni molti approcci computazionali. Questi metodi ipotizzano che i farmaci con struttura chimica simile possono avere obiettivi simili.

Quindi, in considerazione delle interazioni fra una strategia di analisi sistematica per il riposizionamento e la medicina computazionale, gli obiettivi che derivano da questa strategia sono di rendere operative risorse per il:

- supporto scientifico
- supporto tecnologico
- supporto infrastrutturale

Il flusso di lavoro nell'ambito del *drug repositioning* richiede specifiche capacità analitiche e tecnologiche. La sinergia tra competenze applicabili nei diversi campi scientifico-molecolari (biochimico, biologico molecolare e cellulare, bioinformatico, genetico e medico) assicura l'ottimizzazione di ogni singolo passaggio operativo e favorisce con efficienza l'integrazione di nuovi approcci multidisciplinari.

Obiettivo: fornire supporto scientifico, tecnologico e infrastrutturale al flusso di lavoro per il *drug repositioning* mediante l'implementazione di un Centro di Eccellenza

Bibliografia

1. Healthcare, E.S.G.o.S., Acting Together: A roadmap for sustainable healthcare, in White Paper. 2014, Università Cattolica del Sacro Cuore, Abbvie

2. Yvonne Y Li and Steven JM Jones Drug repositioning for personalized medicine Genome Medicine 2012, 4:27

Topic III-1 Messa in rete dei centri di ricerca di farmacogenomica

Alcuni parametri delle analisi Omics, inclusa la farmacogenomica, influenzano gli effetti clinici di alcuni farmaci e possono ora essere testati in modo affidabile per un utilizzo in ambito clinico. Questo processo può significativamente influenzare l'attività prescrittiva in base agli esiti ottenuti, ad esempio determinando il sottogruppo di pazienti in cui l'effetto del farmaco è massimizzato, la dose efficace o la predizione degli eventi avversi. La conoscenza di queste informazioni ha un carattere preventivo, in quanto può essere applicata a individui sani che potrebbero anche non assumere il farmaco. La conoscenza del fenotipo individuale può avere importanti ricadute, specialmente nelle popolazioni fragili, per esempio in ambito pediatrico o durante la gravidanza, in cui il farmaco viene somministrato in un soggetto caratterizzato da notevoli variabilità funzionali e biologiche e di cui non si conosce la storia clinica.

Dalla farmacogenomica possono inoltre essere estrapolate informazioni sul farmaco che possono descrivere :

- la variabilità della risposta clinica
- il rischio di eventi avversi
- il dosaggio genotipo-specifico
- il meccanismo d'azione

Molte di queste informazioni sono già disponibili ma è difficoltosa la raccolta e l'analisi. Occorre mappare i centri clinici in cui sono disponibili i dati, metterli in rete e analizzarli da un punto di vista farmacologico (risposta terapeutica e sviluppo di effetti avversi) in maniera rigorosamente critica e scientifica. L'analisi farmacogenetica può dare utili indicazioni per una successiva analisi farmacogenomica, con l'utilizzo di campioni biologici opportunamente conservati (Biobanche).

Si può anche considerare la possibilità di condurre uno studio prospettico su una popolazione isolata, omogenea, non estremamente numerosa ma esemplificativa. Uno studio farmacogenomico di coorte in cui associare le informazioni degli studi Omics con la risposta ai farmaci.

Attualmente il numero di farmaci per i quali le informazioni genomiche possono fornire indicazioni cliniche è ancora piccolo e necessita di ulteriori approfondimenti. L'attività prescrittiva potrebbe tuttavia ottenere significativi vantaggi da un utilizzo più integrato dei test genetici/genomici nella pratica clinica.

Topic IV: Opportunità per la sostenibilità di sistema mediante la prevenzione pre-primaria finalizzata alla riduzione del *burden* di malattia

Un ulteriore aspetto della sostenibilità di importanza strategica è quello del *burden* di malattie croniche non trasmissibili. Non si tratta solo di ridurre il *burden* attuale (obiettivi WHO) ma anche quello a carico delle fasce di popolazione infantile adesso e nel prossimo futuro. Da questo punto di vista elementi di allarme rilevanti derivano dall'osservazione già attuale dell'aumento di incidenza nell'infanzia e primissima infanzia, ad

esempio, dell'obesità (*diabesity*) e dei tumori, oppure dei disturbi del neurosviluppo. Questo pone l'attenzione sul tema dell'epigenetica e del possibile - in alcuni casi documentato - effetto degli inquinanti sul feto e /o sulla trasmissione transgenerazionale. Lo sviluppo dell'epigenetica attraverso grandi studi di popolazione (analisi epigenetica sul sangue cordonale) si candida ad essere un *asset* per il futuro immediato e prossimo (5-10anni) come capacità del sistema sanitario di identificare e prendere in carico i soggetti a rischio 'omico' di sviluppare patologie croniche.

Questo scopo può essere raggiunto con l'uso di tecnologie innovative a partire da esperienze pilota già implementate in Italia. In particolare: biobanche (sviluppo del progetto "Piccolipiù" presso l'ISS) e la valutazione dell'esposizione ad inquinanti la matrice aerea (PM10 e PM2.5) mediante l'integrazione di dati satellitari e variabili al suolo.

L'obiettivo che deriva da questa strategia è di acquisire elementi per una valutazione di fattibilità ed efficacia.

Le azioni principali sono:

- implementazione di un network di biobanche di popolazione (tale obiettivo è sinergico a quello del Topic I)
- realizzazione di uno studio pilota in aree a grande impatto di inquinamento ambientale.

Bibliografia

1. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 1999;29:1181-9.
2. Fiehn O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* 2002;48:155-71.
3. Pauling L, Robinson AB, Teranishi R. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:2374-6.
4. Mussap M, Antonucci R, Noto A, Fanos V The role of metabolomics in neonatal and pediatric laboratory medicine. *Clin Chim Acta* 2013, 426:127-38.
5. Fanos V, Locci E, Noto A. Urinary metabolomics in newborns infected by human cytomegalovirus: a preliminary investigation. *Early Hum Dev.* 2013, Suppl 1: S58-61.
6. Wang JH. Analytical approaches to metabolomics and applications to systems biology. *Semin Nephrol.* 2010;30: 500-511.
7. Jewison T, Su Y, Disfany FM. SMPDB 2.0: Big Improvements to the Small Molecule Pathway Database. *Nucleic Acids Research* 2014;42:D478-484.
8. Fiehn O, Robertson D, Griffin J. The metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics* 2007; 3:175-178.
9. Bouatra S, Aziat F, Mandal R. The human urine metabolome. *Plos one* 2013;8:e73076.
10. Saude EJ, Sykes BD. Urine stability for metabolomic studies: effects of preparation and storage. *Metabolomics* 2007; 3:19-27.
11. Gika H. G., Theodoridis G. A. & Wilson, I. D. Liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry fingerprinting of human urine: sample stability under different handling and storage conditions for metabonomics studies. *J. Chromatogr. A* 2008;1189: 314-22

12. Weljie A, Newton J, Mercier P. Targeted profiling: quantitative analysis of 1H-NMR metabolomics data. *Anal Chem* 2006;78:4430-4442.
13. Brereton, R.G. *Chemometrics for pattern recognition*. New York: Wiley & Sons, Inc; 2009.
14. Semmar, N. "Computational Metabolomics", Nova Biomedical Books, NewYork, 2011
15. Azuaje, F. "Bioinformatics and Biomarker Discovery" Wiley-Blackwell UK, 2010
16. Nieves, J. Jewett M.C. "Metabolomics. A powerful tool in System Biology", Springer, 2007
17. NMR spectra of biofluids. *Analyst* 2002, 127:1283-1288.
18. Evaluation and identification of dioxin exposure biomarkers in human urine by high-resolution metabolomics, multivariate analysis and in vitro synthesis. Jeanneret, Fabienne; *Toxicology letters* 2016, DOI:10.1016/j.toxlet.2015.10.004
19. Wang Z. Human Metabolic Responses to Chronic Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure by a Metabolomic Approach. *J. Proteome Res.* 2015
20. Long SM. A multi-platform metabolomics approach demonstrates changes in energy metabolism and the trans-sulfuration pathway in *Chironomus tepperi* following exposure to zinc. *Aquatic Toxicology* 2015.
21. Zhang W. Metallomics and NMR-based metabolomics of *Chlorella* sp. reveal the synergistic role of copper and cadmium in multi-metal toxicity and oxidative stress. *Metallomics* 2015

Topic V : Opportunità per la sostenibilità di sistema mediante la prevenzione secondaria finalizzata alla riduzione del *burden* di malattia del cancro al seno

Così come nel trattamento del carcinoma mammario (CaM) si sta spostando verso una personalizzazione delle terapie con farmaci ad azione mirata alle caratteristiche del tumore e delle pazienti altrettanto è necessario procedere ad individuare caratteristiche delle donne che consentano una stratificazione del rischio per personalizzare gli interventi di prevenzione secondaria. Per la donna italiana è stato calcolato un rischio *life-time* del 11% circa di sviluppare CaM: questa quota di donne, in realtà, è costituita da tanti sottogruppi di donne a diverso rischio, alcuni a rischio molto più basso altri a rischio molto più alto. E' stato stimato che il rischio medio della donna americana di sviluppare CaM calcolato mediamente nel 11.3% comprenda al suo interno 10 categorie di rischio assoluto che vanno dal 4.4% al 23.5% sulla base della valutazione del possibile impatto dei fattori di rischio non modificabili.

Numerosi studi hanno valutato la possibilità di creare un profilo di rischio per ciascuna donna che si appresta ad entrare in un programma di prevenzione secondaria utilizzando, oltre ai fattori di rischio tradizionali e la densità mammografica (esistono numerose evidenze che la densità mammografica ed il CaM condividano componenti genetiche) uno score derivato dalla valutazione dell'impatto sul rischio della presenza di varianti comuni nella popolazione generale (*Polygenic Risk Score* – PRS). Sono inoltre stati riscontrati differenti profili di rischio genetico nelle donne che hanno avuto il cancro diagnosticato con il test di screening e quelle con cancro intervallare.

Un intervento sui fattori di rischio modificabili (BMI; uso di terapia ormonale menopausale, consumo di alcool e fumo di sigaretta) può diminuire sensibilmente i rischi più elevati. Per le donne con un rischio basso (intorno al 4%) di sviluppare CaM lo screening secondo il modello tradizionale potrebbe rappresentare un intervento eccessivo (in ragione anche del non trascurabile rischio di sovradiagnosi di lesioni indolenti) mentre per le

donne con rischio elevato è verosimilmente insufficiente (elevato tasso di ca. intervallo, cancro avanzati alla diagnosi).

Utilizzando in maniera complementare i diversi fattori si può ottenere una stima predittiva abbastanza accurata del rischio che potrebbe nel futuro differenziare le raccomandazioni per lo screening (età all'inizio, frequenza e metodo) e per i gruppi a rischio più elevato proporre interventi di prevenzione farmacologica per ridurlo. Quindi un'accurata stima del rischio di sviluppare tumore della mammella può rappresentare un indiscutibile vantaggio non solo per le donne ma anche per il SSN che potrebbe utilizzare le sempre più scarse risorse in modo più appropriato migliorando il rapporto costo-rischi-benefici.

Obiettivi:

- costruire uno score che consenta una stratificazione del rischio di CaM;
- valutare l'applicabilità dello score prodotto per proporre una modulazione personalizzata dello screening;
- verificare la fattibilità di interventi farmacologici per la riduzione del rischio al di fuori del *setting* sperimentale.

Bibliografia

1. Maas P, Barrdahl M, Joshi AD, Auer PL, Gaudet MM, Milne RL, Breast Cancer Risk From Modifiable and Nonmodifiable Risk Factors Among White Women in the United States. *JAMA Oncol.* 2016 May 26. Doi: 1001/jamaoncol.2016.1025.
2. Boyd NF, Dite GS, Stone J, Gunasekara A, English DR, McCredie MR, et al. Heritability of mammographic density, a risk factor for breast cancer. *N Engl J Med.* 2002; 347: 886-94;
3. Stone J, Dite GS, Gunasekara A, English DR, McCredie MR, Giles GG, et al. The heritability of mammographically dense and nondense breast tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:612-7.
4. Brand JS, Humphreys K, Thompson DJ, Li J, Eriksson M, Hall P, Czene K. Volumetric mammographic density: heritability and association with breast cancer susceptibility loci. *J Natl Cancer Inst.* 2014; 106(12). Doi: 10.1093/jnci/dju334.
5. Li H, Feng B, Miron A, Chen X, Beesley J, Bimneh E, 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.* 2016 May 12. Doi: 10.1038/gim.2016.43);
6. Mavaddat N, Pharoah PD, Michailidou K, Tyrer J, Brook MN, Bolla MK, et al. Prediction of breast cancer risk based on profiling with common genetic variants. *J Natl Cancer Inst.* 2015; 107(5); djv036.
7. Schmidt MK, Hogervorst F, van Hien R, Cornelissen S, Broeks A, Adank MA, et al. Age- and Tumor Subtype-Specific Breast Cancer Risk Estimates for CHEK2*1100delC Carriers. *J Clin Oncol.* 2016 Jun 6. Pii: JCO665844.
8. Li J, Holm J, Bergh J, Eriksson M, Darabi H, Lindström LS, et al. Breast cancer genetic risk profile is differentially associated with interval and screen-detected breast cancers. *Ann Oncol.* 2015; 26: 517-22.
9. Holm J, Humphreys K, Li J, Ploner A, Cheddad A, Eriksson M, Törnberg S, Hall P, Czene K. Risk factors and tumor characteristics of interval cancers by mammographic density. *J Clin Oncol.* 2015; 33:1030-7.

Topic VI: Opportunità per la sostenibilità di sistema mediante la diagnosi precoce finalizzata alla riduzione del *burden* di malattia del cancro

Poiché il cancro rimarrà un importante problema di salute nella società moderna almeno per il prossimo decennio, è imperativo sviluppare strategie innovative basate sulle più recenti scoperte delle 'scienze omiche'.

In tutte le strategie di diagnosi precoce operative fino ad oggi ci sono due limitazioni intrinseche:

- quando la diagnosi evidenzia un risultato positivo, il cancro ha spesso già sviluppato una dimensione che limita le possibilità di intervento;
- per la maggior parte dei tumori, la diagnosi richiede metodologie invasive o semi-invasive, aumentando il disagio del paziente.

Recenti studi di alto profilo in una varietà di istituti di ricerca hanno messo in luce i legami intimi tra cancro e metabolismo cellulare. Studi recenti (condotti presso il Centro di epigenetica e Metabolismo presso l'Università della California) hanno portato a definire una metodologia innovativa, riproducibile e completa per 'leggere' l'insorgenza di cancro dal sangue di pazienti. È stato possibile identificare una '*metabolic signature*' che identifica la presenza del tumore in tutto l'organismo semplicemente analizzando il siero con la analisi metabolomica mediante spettrometria di massa (*MS metabolomics*).

Obiettivi:

- utilizzo della Metabolomica nella diagnosi precoce del cancro;
- pervenire a definire un paradigma da applicare in altri contesti nazionali e internazionali.

Il programma potrebbe essere suddiviso in almeno due sezioni principali:

- *Metabolomica come diagnosi precoce del cancro.* Considerando che allo sviluppo di un cancro è associata una specifica '*metabolic signature*' si tratta di organizzare una rete di operatori che lavorerà di concerto per l'analisi metabolomica di campioni umani provenienti da pazienti affetti da cancro. Tale *partnership* è previsto coinvolga IRCCS, ospedali, centri di oncologia (nella funzione di reclutatori) e una struttura di riferimento internazionale (come il *Center for Epigenetics and Metabolism-University of California*). I campioni saranno divisi a seconda del tipo di tumore, stadio, sesso, età e tutti gli altri parametri pertinenti. Come controllo saranno utilizzati campioni da individui non portatori di tumore. I campioni saranno analizzati da CEM California e i dati saranno raccolti in base alla classificazione del tipo di cancro.
Per tutti i campioni sarà eseguita un'analisi bioinformatica allo scopo di identificare un'unica '*metabolic signature*' per i diversi tipi e stadi dei tumori.
- *Esplorazione del macro-ambiente derivato dal cancro.* Gli studi condotti del CEM hanno stabilito che tumori specifici generano un unico macro-ambiente che può essere 'letto' nel sangue di pazienti affetti da cancro mediante *MS metabolomics* e che in effetti, almeno nei topi, una specifica '*metabolic signature*' inizia ad essere evidente molto presto.

Questo obiettivo si concentra quindi su due temi principali da affrontare prima in laboratorio e poi tradotto in pazienti umani:

- identificazione di un '*metabolic signature*' da topi ed estenderla ai malati di cancro;
- sulla base della '*metabolic signature*' individuare i rischi di patologia associata;
- attuare misure di prevenzione adeguate per correggere lo sviluppo di patologie;
- sviluppo e applicazione di una applicazione smart-phone per informare tutti gli individui dello sviluppo di alterazioni metaboliche

Il CEM provvederà all'analisi metabolomica tramite spettrometria di massa dei campioni, alla interpretazione dei dati (Biocomputing), all'elaborazione del profilo globale di salute e del 'Profilo metabolico' per ogni individuo e gruppi.

Topic VII: I malati senza diagnosi

Anche se non esistono dati epidemiologici certi, probabilmente sono almeno cinquecentomila - un milione i pazienti pediatrici affetti da una malattia rara. Questa definizione accorpa le persone colpite da una delle circa 8000 malattie che hanno una frequenza inferiore ad un caso su 2000 nella popolazione. Circa la metà di esse sono molto rare, interessando meno di una persona ogni 100.000 e, in molti casi, meno di una ogni milione di persone, ma il loro numero complessivo configura comunque un problema sanitario di dimensioni sociali.

Questi dati fissano il contorno delle malattie rare, in particolare la difficoltà nella diagnosi, che spesso viene posta in ritardo o addirittura mai nell'arco della vita; la limitata disponibilità di esperti, di linee-guida utili a definire i livelli minimi di assistenza e di terapie risolutive; la difficoltà per i pazienti ed i loro familiari nel reperire informazioni; la necessità di investire in tutti gli ambiti della ricerca; il senso di solitudine dei pazienti e delle loro famiglie costrette ad affrontare disagi e a sostenere costi gravosi.

A fronte di questi problemi, negli ultimi 10 anni, l'Italia ha costruito una rete di quasi 200 centri accreditati, variabilmente distribuiti tra le regioni, che rappresenta una delle migliori organizzazioni diagnostiche-assistenziali in Europa, come documenta la loro massiccia presenza nelle Reti di Riferimento Europee delle malattie rare.

Quasi due terzi delle malattie rare colpiscono i bambini e circa il 90% ha un'origine genetica. Circa uno ogni tre malati rari non ha una diagnosi e rischia di convivere con una malattia che resterà senza nome. Queste persone, "orfane di diagnosi", ed i loro familiari vivono un isolamento ed una discriminazione persino superiori a quelle che provano gli altri malati rari, dato che la diagnosi è il punto di partenza per costruire il percorso della presa in carico, razionalizzare le scelte terapeutiche e ricevere una consulenza genetica mirata.

Nel 2016 sono state avviate in Italia alcune azioni sinergiche rivolte ai malati senza diagnosi. Un gruppo di medici, liberi professionisti, docenti universitari, imprenditori e amici, accomunati da esperienze di vita che li hanno avvicinati al problema delle malattie senza nome ha dato vita alla *Fondazione Hopen Onlus* (www.fondazionehopen.org), un'organizzazione che si propone di diventare il punto di riferimento per le famiglie e le persone che vivono l'incubo dell'isolamento, dell'abbandono, del non sapere da cosa sono affette. La missione di Hopen è sostenere queste persone, offrire supporto, consulenza e informazioni sul percorso che le famiglie dovrebbero affrontare quando non è disponibile una diagnosi, partecipare al loro vissuto

emotivo, comprendere i loro problemi, creando un senso di appartenenza e solidarietà, collegando le persone colpite dallo stesso problema. Secondo l'associazione gemella *Swan UK* (www.undiagnosed.org.uk) circa il 50% dei bambini con disabilità nell'apprendimento ed il 60% di quelli con difetti multipli non riescono ad avere una diagnosi precisa e definitiva. Questi numeri disegnano due priorità: il bisogno di ricerca orientata a fornire una risposta diagnostica e la necessità di creare ambulatori dedicati alla loro presa in carico.

La *Fondazione Telethon e l'Ospedale Bambino Gesù*, in raccordo con la Rete delle malattie rare, sono in questo momento i due principali alleati di Hopen e sono impegnati ad offrire ai malati senza diagnosi un percorso in grado di accompagnarli dalla definizione della loro condizione clinica alla implementazione di azioni e strategie utili a rispondere ai loro bisogni di salute, e a fornire un'assistenza multi-specialistica prolungata nel tempo.

Le attività di ricerca rivolte alle persone senza diagnosi beneficiano oggi di due acquisizioni fondamentali. Da un lato la nozione che la maggior parte di queste malattie ha una base genetica e perciò la loro origine può essere indagata utilizzando un approccio genetico o genomico; dall'altro lato, la rivoluzione genetica – di fatto una rivoluzione tecnologica – che negli ultimi 15 anni ha abbattuto di circa 100mila volte i costi ed i tempi delle analisi genomiche, aprendo di fatto la possibilità di impiegare queste tecniche su larga scala. Su questi pazienti si utilizzano sia le analisi esomiche, che esaminano quell'1% del genoma dove si localizzano i geni codificanti, che consentono in circa un terzo dei casi di identificare la causa della malattia, sia le analisi dell'intero genoma, che al momento sono penalizzate dalla non completa conoscenza del significato di tutte le varianti identificate e dalla complessità delle indagini bioinformatiche, parte integrante di questi studi.

Il progetto "Malattie senza diagnosi", finanziato da Telethon ed il progetto "Vite coraggiose" dell'Ospedale Bambino Gesù si propongono, con obiettivi parzialmente diversi, di individuare le cause delle malattie genetiche senza diagnosi. La scoperta dei meccanismi biologici di una malattia e della via metabolica implicata contribuiscono a comprenderne meglio la storia naturale e ad ottimizzare i protocolli di presa in carico. La caratterizzazione dei geni responsabili delle malattie rare promuove lo sviluppo di nuovi test diagnostici, identifica nuove malattie, riclassifica malattie simili, delinea nuove correlazioni tra le variazioni genetiche e le caratteristiche cliniche della malattia, consente di implementare programmi di prevenzione e di diagnosi precoce e di offrire una consulenza genetica mirata alla famiglia. I pazienti "orfani" di diagnosi, una volta caratterizzati, vengono messi a confronto, quando possibile, con altri casi simili identificati in altre parti del mondo, per perfezionare la conoscenza degli aspetti clinici della malattia e le possibilità di cura.

L'Unità di Malattie Rare dell'Ospedale Bambino Gesù ha aperto il primo ambulatorio in Italia dedicato ai bambini e alle famiglie senza diagnosi, che opera sia "a distanza", attraverso l'esame della documentazione trasmessa al centro, sia "direttamente", attraverso prestazioni cliniche sui pazienti. Questa nuova attività permette ai genitori di ricevere un parere diagnostico qualificato, con risparmio di risorse per le famiglie già gravate dai costi delle malattie croniche e invalidanti; garantisce prestazioni diagnostiche ed assistenziali multispecialistiche mirate ai reali bisogni del bambino, attraverso la preventiva acquisizione della storia e della documentazione clinica; assicura alle famiglie la gestione del paziente da parte di un *case manager*, che svolge la funzione di tramite nella comunicazione tra la famiglia e gli specialisti che partecipano alla gestione del bambino e che è garante del percorso diagnostico e della condivisione dei referti; ottimizza l'impiego delle risorse disponibili; migliora i tempi di risposta e di intervento e l'appropriatezza prescrittiva.

L'alleanza creata tra assistenza e ricerca, a favore dei pazienti senza diagnosi, si propone come un volano capace di fare uscire queste persone dalla solitudine e dalla discriminazione e di promuovere interventi in

grado di aiutarle a prendere decisioni utili a ridurre le disuguaglianze culturali e sociali, nel rispetto dei loro valori e delle loro aspettative.

L'obiettivo generale è quello di rendere più efficiente il sistema di diagnosi, indirizzando i pazienti candidati a centri di riferimento che possano eseguire analisi esomiche per malattie di sospetta natura genetica non identificata. Tale obiettivo comporta interventi di strutturazione dell'offerta e di sensibilizzazione verso i possibili target e ora i medici non specialistici.

Obiettivi Specifici:

- *Percorso diagnostico-terapeutico-assistenziale di carattere nazionale:* costruire, in raccordo con la rete delle malattie rare, un percorso di livello nazionale per l'invio a centri selezionati dei pazienti eleggibili
- *Efficienza:* abbattere i costi della presa in carico dei pazienti affetti da una probabile condizione genetica, senza diagnosi
- *Piattaforma:* potenziare gli strumenti web-based per migliorare il livello dell'informazione e facilitare la comunicazione fra i vari *stakeholders*
- *Formazione:* sviluppare strumenti di formazione dei medici non specialistici (v. sopra Topic II Formazione e *literacy*)

CAPITOLO 8

APPROFONDIMENTI

8.a Aspetti etici degli approcci genomici

La rapida evoluzione e diffusione di tecnologie di sequenziamento genomico di seconda generazione (*Next Generation Sequencing*, NGS) ha alimentato la discussione su questioni bioetiche connesse all'utilizzo delle stesse, sia in ambito diagnostico, che di ricerca.

Di particolare rilevanza sotto il profilo bioetico, è la gestione di quelli che vengono definiti reperti incidentali (*Incidental Findings*, IF). Con tale termine si definiscono quelle mutazioni o variazioni che possono avere implicazioni cliniche, che vengono riscontrate casualmente attraverso analisi genetiche effettuate per un'indicazione medica differente.

Poiché spesso tali reperti, allo stato delle conoscenze attuali, non sono interpretabili e possono avere un significato incerto, si rende chiara la necessità di disporre di linee guida condivise che supportino la più idonea gestione di questi risultati, nei confronti di quesiti sia clinici, che di ricerca.

Il Comitato Nazionale per la Bioetica (CNB) ha risposto a questa necessità con la stesura di un documento dal titolo "Gestione degli *incidental findings* nelle indagini genomiche con le nuove piattaforme tecnologiche", che si propone di riportare alcune indicazioni scaturite dalla discussione tenutasi all'interno di un Gruppo di Lavoro coordinato dai Proff. Monica Toraldo di Francia e Bruno Dallapiccola.

In sintesi, le raccomandazioni formulate in materia di gestione di reperti incidentali ottenuti con tecnologie di NGS sono così riassumibili:

- I laboratori che effettuano tali test dovrebbero rispondere a requisiti di qualità standardizzati e omogeneamente condivisi a livello nazionale. Si auspica inoltre la creazione di una rete di collaborazione e scambio dati tra laboratori di genetica.
- I centri di genetica dovrebbero condividere regole per la scelta delle tecnologie biomolecolari utilizzate, ed essere provvisti di adeguati mezzi e metodologie per la conservazione del campione biologico e dei dati del paziente.
- Per l'ottenimento di un consenso pienamente informato, sarà necessaria la chiara e completa informazione, attraverso consulenze genetiche pre- e post-test, su potenzialità e limiti della analisi in questione. In particolare, il Professionista incaricato dovrà illustrare il significato del riscontro di reperti incidentali di potenziale valenza clinica e di varianti di significato incerto, ponendo l'attenzione sulle ricadute di tali risultati non solo per il paziente stesso, ma anche per i suoi familiari. Tale professionista è individuato nella figura del Genetista clinico, il quale, nella fase della consulenza post-test potrà avvalersi di altre figure professionali, aventi competenze anche psicologiche, per la gestione ottimale del paziente.

- Discostandosi da quanto proposto dalle raccomandazioni americane del 2013, viene mantenuta la distinzione tra paziente adulto e minore. A tal proposito, si raccomanda che al minore, quando raggiunga la maggiore età, sia data libertà di scelta sulla conservazione o meno del proprio campione e dei propri dati.
- Si ribadisce il diritto del paziente di decidere a priori su quali risultati dell'analisi genetica o genomica essere informato. Si riporta nel documento: *“Il paziente deve essere libero di scegliere se rifiutare le informazioni sugli IF, oppure ricevere solo informazioni relative alle patologie prevenibili o trattabili, o ancora conoscere anche i dati che riguardano condizioni patologiche al momento non prevenibili né curabili”*.
- Viene ribadita la assoluta priorità della finalità diagnostica dei test su quella della ricerca.
- Nel caso di campioni biologici donati per fini di ricerca, il CNB giudica opportuno che vengano riportati i risultati, in caso di rilevanza clinica, solo a soggetti affetti da malattie rare che al momento si trovino ancora senza diagnosi certa, sempre nel rispetto della volontà dei soggetti stessi di essere informati.

Grazie al dibattito creatosi affrontando tali tematiche, è emersa l'importanza di garantire l'acquisizione, da parte delle figure professionali coinvolte, di competenza in campo bioetico, con la finalità non solo di garantire un'assistenza quanto più adeguata, ma anche di diffondere e promuovere la presa di coscienza da parte dei cittadini sull'argomento.

8.b Test genetici diretti al consumatore (Direct to Consumer)

Nel 2007, diverse compagnie hanno iniziato a pubblicizzare e quindi offrire, attraverso Internet, test genetici direttamente ai consumatori. Questa modalità di effettuazione di test genetici, definita *“direct-to-consumer”* (DTC), rende disponibile sul mercato online direttamente per il pubblico (includendo forme di mercato *“over the counter”*, cioè non regolamentato) test su materiale genetico, senza che sia richiesta la supervisione da parte di un professionista sanitario (*European Academies Science Advisory Council, 2012*).

L'utilizzo di test genetici DTC ha avuto un rapido incremento a partire dalla prima commercializzazione nel 2007, e allo stesso modo è andata crescendo la consapevolezza da parte dei cittadini sull'argomento.

Attualmente sono disponibili tre tipi di test genetici DTC:

- 1°) test che indagano una, o poche, specifiche condizioni patologiche
- 2°) test che valutano il profilo di rischio per polimorfismi multipli di singolo nucleotide
- 3°) sequenziamento dell'intero genoma umano.

Ad oggi, in Europa e negli USA vi sono scarsissime norme giuridiche che regolamentino l'utilizzo di questo tipo di test genetici.

Negli Stati Uniti, nel 2013 la *Food and Drug Administration* (FDA) ha vietato la commercializzazione di qualunque tipo di test genetico alla compagnia *23andMe*, per mancanza di conformità con i requisiti legislativi. La FDA ha riconosciuto questo tipo di test come strumento medico non approvato e non regolamentato e si è

dichiarata preoccupata dalle possibili conseguenze della diffusione direttamente ai consumatori di questo tipo di risultati legati a condizioni di salute.

Dal febbraio 2015, la FDA ha approvato la messa in commercio solamente di un numero ristretto di test genetici DTC, tra i quali il test che valuta lo stato di portatore per la Sindrome di Bloom, venduto dalla stessa compagnia *23andMe*. Attualmente, il sito internet della *23andMe* definisce i risultati dei test sul DNA come “*informazioni genetiche legate alla ascendenza e dati genetici grezzi privi di interpretazione da parte della compagnia stessa*”. Nel frattempo, la compagnia ha iniziato a distribuire i propri servizi anche nel mercato del Regno Unito.

In Europa la normativa dei diversi Stati membri è estremamente variabile. In accordo con la legislazione europea corrente, alcuni tipi di test genetici rientrano sotto la regolamentazione dei dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD), e sono pertanto coperti dalla Direttiva 98/79/CE.

La nuova normativa europea in materia di test genetico è in fase di finalizzazione e verrà recepita nel corso dell'anno 2016. Si prevede un periodo di 5 anni per la sua effettiva introduzione, e fondamentalmente richiederà alle aziende di fornire e indicare le evidenze attestanti la validità scientifica dei test.

La Direttiva IVD è stata oggetto delle negoziazioni in sede di cosiddetto ‘trilogo’ tra Parlamento Europeo, Consiglio e Commissione, e vincherà legalmente tutti gli Stati membri, senza la necessità che tale Direttiva venga trasposta all'interno degli ordinamenti nazionali dei singoli stati. Inoltre, la Direttiva IVD proposta, si riferirà a quei test che sono venduti ai consumatori all'interno del mercato online europeo, indipendentemente dalla ubicazione del provider.

In Europa, la maggior parte dei Paesi non ha una legislazione specifica sui DTC, sebbene quasi tutti abbiano leggi che definiscono che i test genetici possono essere effettuati solo se prescritti da un medico, e successivamente ad una consulenza genetica attraverso la quale il professionista fornisce le adeguate informazioni circa la natura, il significato e le conseguenze del test, senza prescindere dal consenso informato della persona interessata.

Tuttavia, alcuni Paesi, come i Paesi Bassi e il Regno Unito, possiedono una legislazione specifica sui test genetici DTC. Nel sistema olandese, l'Atto sullo Screening di Popolazione (*Wet op het bevolkingsonderzoek*), lodato a livello internazionale, si pone a tutela di programmi di screening potenzialmente dannosi, attraverso un sistema di licenze; mentre nel Regno Unito le linee guida della *Human Genetics Commission* non hanno validità legislativa.

Nonostante non ci sia una specifica legge sui test genetici DTC in Slovenia, il paese ha firmato e ratificato un protocollo in aggiunta alla convenzione sui diritti umani e la biomedicina nel 2008, riguardante l'uso di test genetici per scopi di salute, adottato dal Consiglio Europeo.

Benchè la Grecia non abbia una specifica clausola legale in campo di genomica DTC, numerose altre leggi, che includono anche norme di *soft law*, creano un quadro più ampio all'interno del quale i servizi di genomica DTC possono trovare collocazione.

È importante sottolineare che tutti i Paesi menzionati regolano i test genetici DTC solo a livello nazionale e non hanno applicazione sui test offerti online da parte di altri Paesi europei o statunitensi (a cui invece è indirizzata la nuova Direttiva IVD).

Infine, l'Australia nel Luglio 2014 ha modificato il *Therapeutic Goods Act* per regolare l'offerta e la pubblicizzazione dei test genetici DTC. Questo tipo di test è vietato in Australia, eccetto nei casi specificamente approvati dalla *Therapeutic Goods Administration*.

I test genetici diretti ai consumatori, oltre ad avere evidenze scientifiche limitate sui loro potenziali benefici, potrebbero essere dannosi, se non accompagnati dalla necessaria consulenza genetica professionale

conforme alla legislazione del singolo Paese. Inoltre, la scoperta incidentale di varianti di significato incerto può sollevare preoccupazioni inutili, o interventi inappropriati. Sono state sollevate altre questioni rilevanti, come la protezione dei dati personali nei database, la discriminazione da parte dei datori di lavoro e delle compagnie di assicurazione sanitaria, e la mancanza di disponibilità di un servizio di genetica per la diagnosi e/o la prevenzione, dovuta alla assenza o non competenza degli operatori sanitari.

In alcuni casi, su questo tipo di test, mancano dati riguardo la trasparenza del controllo qualità, riguardo la validità clinica (ad esempio sulla forza di associazione che determina la capacità del test di identificare o predire con accuratezza e affidabilità la patologia di interesse), e la utilità clinica (ad esempio sul bilancio tra rischi e benefici quando il test viene utilizzato per modificare la gestione di un paziente).

Per di più, sono stati associati all'uso di test genetici DTC anche problematiche concernenti disuguaglianze sociali, follow-up non appropriati, ansia, e conseguenze psicosociali negative. Nel 2013, il Parlamento Europeo ha pubblicato i risultati di un'indagine sui test genetici diretti ai consumatori, dalla quale è emerso che la maggior parte dei fornitori di questo tipo di test non mette a disposizione dei consumatori sufficienti informazioni riguardo la natura del test, l'interpretazione dei relativi risultati e le implicazioni che derivano dall'effettuazione del test.

Al fine di supportare il processo decisionale della politica a livello dell'Unione Europea, è stata pubblicata una revisione sistematica sulle prese di posizione, le politiche, le linee guida e le raccomandazioni prodotte da organizzazioni professionali o altri importanti attori, in materia di test genetici DTC e loro utilizzo. In tutti i 17 documenti inclusi nella revisione, i potenziali svantaggi dei test genetici diretti ai consumatori superavano i potenziali benefici.

8.c L'-omica batterica

Verso la medicina dei sistemi

Una nuova sfida dell'-omica, successiva alla decodificazione del genoma umano, è la definizione delle basi molecolari delle malattie, utilizzando informazioni che vengono dai prodotti a valle del genoma umano e dai metagenomi e dai prodotti delle comunità microbiche che abitano i vari distretti dell'organismo. Queste ricerche sono state rese possibili dalla disponibilità di nuove piattaforme tecnologiche, che consentono di passare dall'analisi di un numero limitato di bersagli molecolari (approccio convenzionale "riduzionista" o "discreto"), ad un approccio più generale di tipo "olistico", in grado di valutare l'intero contenuto molecolare (*genomico*) o funzionale (*metabolomico*, *proteomico*) del "sistema biologico".

La "biologia dei sistemi" è diventata una disciplina autonoma in grado di generare metodi utili ad approcciare la "medicina dei sistemi". La mole di dati generati dai genomi e dai loro prodotti, i cosiddetti "*big data*", è in grado di produrre modelli clinici, senza ipotesi a priori, e di fornire informazioni capaci di descrivere il sistema biologico nel suo insieme. In questo ambito, l'analisi del reguloma (l'insieme degli elementi regolatori come i geni, gli mRNA, le proteine, i metaboliti) può aiutare ad interpretare il meccanismo molecolare dell'intero sistema DNA-proteine; il mutoma può fornire la mappa dell'insieme delle mutazioni geniche nucleari, associate o meno ad una malattia; l'epigenoma può classificare i cambiamenti chimici del DNA, delle proteine e degli istoni, in diverse condizioni ambientali; l'esoma può analizzare gli RNA maturi dopo rimozione intronica mediante meccanismi di *splicing* dell'RNA; il trascrittoma può catalogare i vari RNA, tra i quali quelli tradotti in proteine, che garantiscono il flusso paradigmatico dal genotipo al fenotipo.

Le tecnologie della proteomica e della metabolomica analizzano i prodotti del genoma (cioè il proteoma e il metaboloma) in grande dettaglio e profondità, caratterizzando proteine, metaboliti, mappe metaboliche, profili di glicosilazione proteica e contenuto lipidico. Conoscere questi aspetti significa realizzare un'integrazione dei dati appartenenti a livelli di organizzazione biologica profondamente diversi ed interpretare il flusso delle informazioni biologiche dai geni ai loro prodotti. Nonostante gli importanti progressi in questi campi, esiste ancora un sostanziale divario tra i dati sperimentali e la medicina pratica, soprattutto quando queste nuove conoscenze vengono valutate in termini di utilità clinica e, perciò, di beneficio per il paziente. Per trasferire la medicina dei sistemi nella pratica clinica, le comunità scientifiche e cliniche necessitano di condividere i dati, avendo accesso a database controllati, annotati e disponibili, così come è accaduto per lo *Human Genome Project*.

In quest'ottica, un approccio promettente è rappresentato dalla ricostruzione delle reti molecolari funzionali, mediante l'integrazione di dati di elevata qualità, ottenuti dalla genomica funzionale e dalla proteomica, che contribuiscono alla panomica, basata sulla combinazione di informazioni sui geni, sulle proteine, sulle vie metaboliche e sulle caratteristiche cliniche dei pazienti.

La medicina dei sistemi e le scienze -omiche, inclusa la metagenomica, stanno progressivamente trasferendo alla clinica le evidenze desunte dalla ricerca traslazionale sui sistemi complessi e sul microbiota umano.

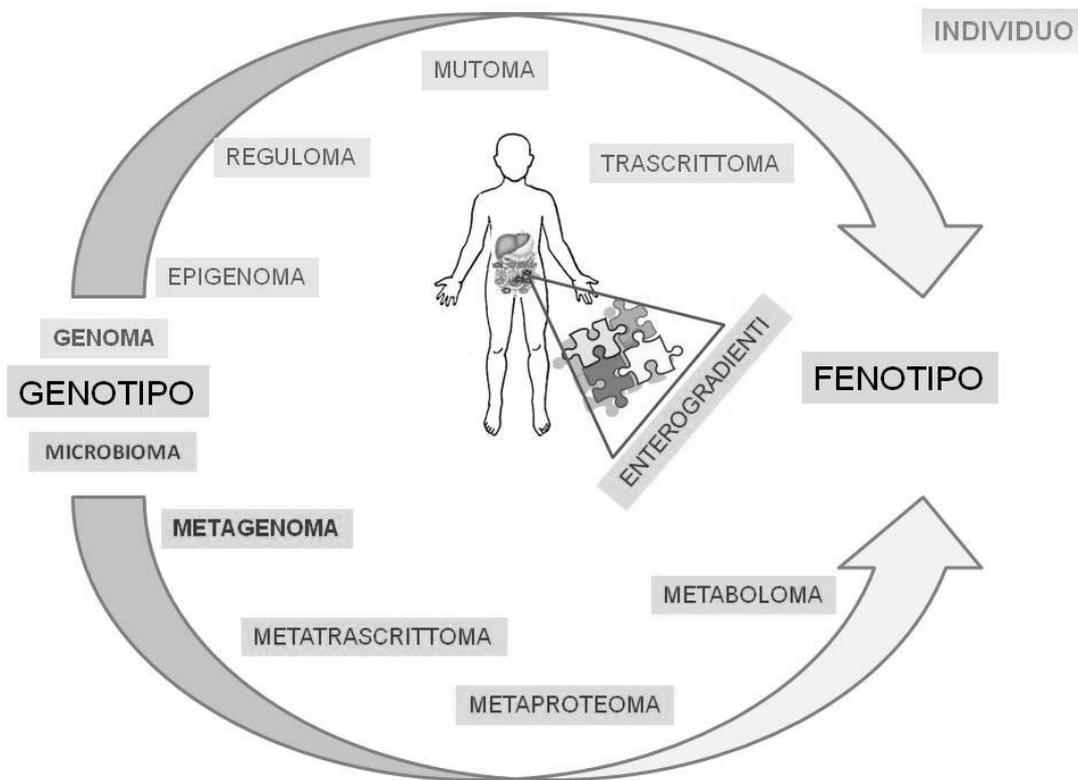
L'ecosistema microbico intestinale

Il microbiota intestinale è un complesso ecosistema costituito da 10^{14} batteri, altamente eterogeneo in termini di diversità microbica. Il suo intero contenuto genomico o microbioma, che è oltre 100 volte più grande rispetto al genoma umano, viene definito metagenoma. I componenti microbici del microbiota rivestono un ruolo fondamentale nella salute, agendo come barriera contro i patogeni e arginando l'invasività della mucosa intestinale con una modalità altamente dinamica, esercitando funzioni metaboliche, fungendo da cuscinetto per effetto-massa e stimolando lo sviluppo del sistema immunitario dell'ospite.

Le tecnologie -omiche (genomica, metabolomica, proteomica) stanno contribuendo a conoscere l'ecosistema del microbiota, a chiarire gli aspetti della tassonomia delle sue comunità microbiche (i filotipi), della loro modulazione e dell'interazione attiva con gli stimoli esterni ed il cibo (metabotipi), nel contesto della variabilità genetica dell'ospite. Utilizzando un approccio interdisciplinare che si colloca all'interfaccia tra la ricerca di base e la clinica, si sta descrivendo il ruolo del microbiota nell'insorgenza e nella progressione di varie malattie, dalla simbiosi fisiologica, l'eubiosi, allo stadio della disbiosi microbica.

La caratterizzazione (*profiling*) del microbiota umano consente di valutare, anche se ancora in modo indiretto, le più importanti modificazioni che l'ambiente (esposoma) può esercitare sul genoma dell'ospite. Tale caratterizzazione, che ha assunto recentemente il ruolo di un test diagnostico, permette di riconsiderare le correlazioni genotipo-fenotipo in condizioni fisiologiche e patologiche nell'infanzia e nell'età adulta, attraverso l'individuazione degli enterogradienti del microbiota. Le informazioni metaomiche che ne derivano integrano quelle ricavate dalle altre tecniche e discipline -omiche nella descrizione del genoma dell'ospite e dei suoi prodotti (Figura 4).

Figura 1. Interazioni individuali genotipo-fenotipo basate sulla caratterizzazione del microbiota, ottenuta con strategie -omiche e meta-omiche integrate.



Quando diversi fenotipi patologici, associati ad una singola modificazione genetica, vengono catalogati e associati agli enterotipi microbici, l'insieme dei profili fenotipici diventa pleiotropico. E' possibile allora fare riferimento ad un "superorganismo", che implica un ruolo diretto o indiretto del microbiota sulle malattie. Per ottimizzare lo studio delle comunità complesse del microbiota intestinale, sono necessari strumenti genomici avanzati, in particolare le tecniche di sequenziamento di seconda generazione, incluso il pirosequenziamento. Queste tecnologie superano i limiti posti dall'isolamento e dalla coltura microbiologica e sono in grado di correlare/comparare specifici profili batterici a patologie di varia natura.

Metagenomica e microbiota umano

Le nuove tecnologie non solo hanno evidenziato la complessità dell'ecosistema del microbiota, ma anche hanno permesso di identificare nuove popolazioni batteriche, affrancandosi dai vecchi approcci coltura-dipendente. Le principali tecniche utilizzano: (a) sonde oligonucleotidiche ed oligonucleotidi che ibridizzano sequenze di RNA ribosomale su piattaforme, come il DNA-*microarray* e l'ibridazione fluorescente *in situ*; (b) eterogenei profili di PCR di comunità complesse, ottenuti mediante elettroforesi in gradiente denaturante e di temperatura (esempio PCR-DGGE e PCR-TGGE); (c) PCR *real-time* per l'analisi qualitativa e quantitativa; (d) metagenomica; (e) proteomica e metaproteomica.

Anche se la composizione delle specie batteriche presenta sostanziali differenze interindividuali e varia nel tempo, le attività codificate dal microbioma sono maggiormente stabili. Questo non sorprende, in quanto la maggior parte della popolazione microbica condivide un gruppo di geni richiesti per l'adattamento all'ambiente intestinale. Pertanto, l'analisi della diversità e della composizione delle specie e delle loro caratteristiche

metaboliche fornisce le basi la comprensione dello stato di salute e di malattia in tutte le età della vita. Gli studi metagenomici su campioni mucosali e fecali ottenuti dalla persone sane hanno associato tale diversità alla presenza di Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Spirochaetes e Actinobacteria.

L'analisi del microbiota comprende un approccio metagenomico e metabolomico. Mentre gli studi genomici identificano le associazioni tra le variazioni del genotipo e dei fenotipi della malattia, quelli metabolomici correlano i fenotipi metabolici ai fenotipi della malattia. Attraverso la produzione di composti antimicrobici, acidi grassi volatili e acidi biliari chimicamente modificati, il microbiota intestinale crea un ambiente metabolicamente molto reattivo, definito bioreattore.

Le analisi metaboliche $^1\text{H-NMR}$, GC-MS degli estratti fecali forniscono importanti chiarimenti sulle differenze metaboliche interspecie dei componenti del microbiota e consentono di ottenere informazioni diagnostiche importanti nel caso delle malattie intestinali. In base alle componenti strutturali delle sue cellule, il microbiota intestinale comunica con l'ospite con un profilo di secrezione caratteristico e partecipa al metabolismo dell'ospite. Questo secretoma o metaboloma delle piccole molecole è accessibile nelle feci e nelle urine. Le tecnologie $^1\text{H-NMR}$, GC-MS e LC-MS permettono di monitorare i cambiamenti dei metaboliti, intesi come concentrazione e proprietà chimiche. I profili metabolici ottenuti in combinazione con le analisi multivariate, contribuiscono ad analizzare la cooperazione metabolica ospite-microbiota rispetto al fenotipo, alla patologia e alla dieta. L'analisi combinata del metaboloma nei diversi liquidi biologici, compresi gli estratti delle acque fecali, il plasma e le urine, consente di stabilire collegamenti tra la bioconversione degli ingredienti dei cibi non-digeribili, la loro bio-disponibilità e il loro effetto sul metabolismo dell'ospite, anche in relazione con la patologia concomitante.

E' stata ampiamente documentata la complessità del microbiota intestinale e l'effetto modulatore esercitato da diversi fattori endogeni ed esogeni. L'alimentazione nei primi mesi di vita è uno dei principali determinanti della salute del bambino, nonché del benessere successivo dell'adulto. Infatti, la modulazione del microbiota in epoca perinatale ed infantile influenza lo sviluppo del sistema immunitario ed il successivo stato di salute. Lo sviluppo del microbiota intestinale correla con la sensibilizzazione allergica nella prima infanzia e predispone agli sbilanciamenti metabolici alla base dell'obesità e del rischio cardiovascolare in età adulta.

The Human Microbiome Project, promosso dal *National Institutes of Health*, si propone di identificare e di caratterizzare i *taxa* dei microbioti umani ed il loro rapporto con lo stato di salute e di malattia. Già oggi è chiaro che il microbiota svolge un ruolo sulla salute molto più importante di quanto si potesse immaginare. Comprendere le dinamiche delle popolazioni batteriche e governarle, piuttosto che aggredirle con antibiotici, potrebbe rivelarsi strategica per sconfiggere numerose malattie ed i crescenti fenomeni di resistenza antimicrobica. Di conseguenza, si potrebbero gestire le comunità microbiche in base al loro contenuto ed equilibrio metabolico.

Il sequenziamento genico ha consentito di avviare l'analisi delle comunità microbiche, che spesso presentano interazioni molto complesse. Di conseguenza, è venuto meno il classico concetto di infezione associata ad un singolo organismo, essendo stato scoperto che varie malattie sono causate dagli squilibri nella popolazione degli organismi che comunicano con l'ospite. Questo nuovo modello può essere allargato a diversi quadri patologici, non solo quelli strettamente infettivi. Si ritiene che le alterazioni del microbiota concorrano a molte malattie infiammatorie croniche, alle allergie, al diabete, all'obesità. Tanto più è elevata la diversità, tanto minore è la probabilità che i patogeni esterni invadano e si stabiliscano all'interno dell'organismo. Infatti, se tutte le nicchie sono occupate, diventa difficile per gli "invasori" collocarsi fisicamente e divenire operativi. Tuttavia, il ruolo del microbiota nella patogenesi non si limita alla "competizione

esclusiva”: infatti il microbioma interagisce con l'ambiente e con il patrimonio genetico costituzionale. In sostanza, ogni persona possiede due patrimoni genomici: quello costituzionale ed il microbioma. Le fluttuazioni nelle popolazioni del microbiota si possono tradurre nella disbiosi e perciò nell'insorgenza di patologie e, rispettivamente nella loro regressione. La capacità di governare queste fluttuazioni può aprire nuove prospettive alla medicina del futuro, attraverso azioni mirate sulle componenti modificabili del microbiota.

8.d Test post-natali per le malattie cardiovascolari mendeliane

Negli ultimi 25 anni sono stati individuati i geni responsabili di diverse forme ereditarie di patologie cardiache aritmiche e/o strutturali associate a morte improvvisa. Ciò ha determinato l'introduzione di numerosi test genetici e un notevole sviluppo della cardiogenetica in ambito clinico. Le patologie in questione sono diverse (Tabella 14), e nel complesso sono comuni nella popolazione generale (ad es., la prevalenza stimata delle cardiomiopatie ipertrofiche è di circa 1 su 500; quella della sindrome del QT lungo circa 1 su 2.000). Sono state sviluppate linee guida per la diagnosi, la sorveglianza e il trattamento dei soggetti affetti da queste condizioni così come dei soggetti (ancora) sani portatori delle alterazioni genetiche causali.

Anche grazie allo sviluppo delle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione, l'applicazione dei test cardiogenetici è quindi in grande crescita. Ciò comporta un rischio di incremento di richieste e usi impropri, anche perché l'utilità dei test varia a seconda delle diverse condizioni genetiche. A causa della notevole eterogeneità genetica e della incompleta detection rate (compresa tra il 20% e il 75% circa, a seconda della patologia) un esito negativo di un test genetico non esclude di per sé la possibilità che un individuo sia affetto dalla patologia per cui è stato richiesto il test. Inoltre questi test sono spesso complicati dal riscontro di varianti di significato incerto (VUS).

Il documento di riferimento è l'“*Expert Consensus Statement on the State of Genetic Testing for the Channelopathies and Cardiomyopathies*”, riguardante in modo specifico i test genetici stilato congiuntamente dai principali esperti in materia di diversi continenti. L'impiego dei test genetici è discusso anche in altri documenti focalizzati sulla diagnosi e la terapia di alcune di queste condizioni, tutti approvati dalle società scientifiche cardiologiche nazionali e internazionali. Come per le altre patologie genetiche su base mendeliana, le evidenze disponibili non derivano da studi randomizzati o condotti in cieco, bensì dai dati di registri specifici per patologia. Le raccomandazioni sono quindi per definizione basate su livelli di evidenza C (opinione di esperti).

Il PDTA per queste patologie deve prevedere:

1. Riconoscimento della condizione
2. Ricorso alla diagnosi genetica nei probandi in base al quadro clinico
3. Test a cascata nei familiari sani una volta accertata la presenza di una variante genetica familiare responsabile della patologia
4. Attuazione delle opportune misure preventive e terapeutiche nei soggetti a rischio

Per quanto riguarda il punto 1, è necessario che la diagnosi sia formulata rispettando criteri condivisi dalle società scientifiche nazionali e internazionali del settore, da cardiologi esperti di elettrofisiologia e in particolare di cardiopatie aritmiche genetiche. È stato stimato che le canalopatie occupano meno del 20% della

formazione dei cardiologi elettrofisiologi pediatrici e meno del 10% di quella degli specialisti dell'adulto. Ciò implica la necessità di colmare le carenze formative su questi temi.

In merito al punto 2, il grado di evidenza e la forza delle raccomandazioni sull'esecuzione del test genetico variano tra le diverse patologie (Tabella 14) e dipendono:

1) dalla sensibilità, specificità, potere predittivo positivo (PPV) e potere predittivo negativo (diversi tra i gruppi di patologie considerati) in relazione al quadro clinico

2) dalla disponibilità di interventi terapeutici/preventivi efficaci (solo per alcune patologie le persone a rischio possono giovare di trattamenti efficaci, a volte specifici per particolari assetti genetici).

Per una stessa condizione il grado di evidenza in favore dell'esecuzione del test genetico diagnostico può essere diverso a seconda del quadro clinico.

Per il punto 3, l'esecuzione del test genetico a cascata nei familiari sani a rischio è sempre raccomandata quando sia stato individuato il difetto genetico responsabile del quadro clinico del probando. Non è invece considerata l'esecuzione del test in persone sane con storia familiare positiva qualora non sia stata individuata la variante genetica causale familiare oppure non sia stato condotto nessun test su un parente affetto.

Infine, per il punto 4, le misure raccomandate, per le quali sono necessarie competenze cliniche specifiche, comprendono: uso di farmaci per ridurre il rischio di episodi aritmici, controindicazione di specifici farmaci che possono innescare episodi aritmici, impianto di defibrillatori, denervazione simpatica cardiaca sinistra, identificazione e correzione di anomalie elettrolitiche causate da alimentazione o episodi di vomito/diarrea, valutazione dell'opportunità di eseguire attività fisica a livello competitivo.

È raccomandato un approccio multidisciplinare, con il coinvolgimento di cardiologi specializzati nelle patologie cardiache ereditarie e genetisti, per assicurare la competenza necessaria a svolgere una adeguata consulenza genetica. È opportuno che il processo di consulenza pre- e post-test e il test genetico stesso siano svolti presso centri esperti nella valutazione genetica e nel trattamento delle suddette patologie.

L'analisi di un grande numero di geni aumenta inoltre la probabilità di individuare varianti genetiche di significato incerto (VUS). La probabilità di individuare VUS varia tra le diverse patologie. Anche per tale motivo si raccomanda di non eseguire questi test in assenza di chiare indicazioni derivate dall'analisi clinica, né tanto meno come screening nella popolazione generale o in particolari gruppi di soggetti sani (es, atleti o prima di intraprendere attività sportive). In casi dubbi può essere utile inviare prima il paziente ad un centro di riferimento.

Tabella 14. Raccomandazioni per i test genetici nelle cardiopatie genetiche aritmiche e strutturali.

Patologia/gruppo di patologie	Test genetico per probandi¹	Test genetico a cascata per familiari¹
Sindrome del QT lungo	Classe I o Classe lib	Classe I
Tachicardia ventricolare polimorfa catecolaminergica	Classe I	Classe I
Sindrome di Brugada	Classe IIa/Classe III	Classe I
Difetto familiare progressivo della	Classe lib	Classe I

conduzione cardiaca		
Sindrome del QT breve	Classe lib	Classe I
Fibrillazione atriale	Classe III	Classe III
Cardiomiopatia ipertrofica	Classe I	Classe I
Cardiomiopatia aritmogena	Classe IIa/Classe IIb/Classe III	Classe I
Cardiomiopatia dilatativa	Classe I/Classe Iia	Classe I
Ventricolo sinistro non compattato	Classe Iia	Classe I
Cardiomiopatia restrittiva	Classe lib	Classe I
Sopravvissuti ad arresto cardiaco in ambiente extra-ospedaliero	Classe I/Classe III (Classe I quando la valutazione clinica indica una possibile/probabile cardiomiopatia ipertrofica o canalopatia)	Classe I
Morte improvvisa	Classe I/Classe IIb (in tutti i casi raccomandata raccolta di campione biologico di tessuto per successive analisi genetiche; il test può essere considerato in casi negativi all'autopsia, in particolare se vi sono elementi della storia personale che suggeriscono la possibilità di specifiche forme aritmiche su base genetica)	Classe I

¹ *Classe I*: raccomandato (PPV > 40% e rapporto tra veri positivi e varianti genetiche di significato incerto > 10; oppure dimostrata utilità ai fini diagnostici prognostici; oppure quando l'esito del test influenza le scelte terapeutiche). *Classe IIa*: può essere utile. *Classe IIb*: può essere considerato. *Classe III*: non raccomandato/non dovrebbe essere eseguito. Per alcune patologie sono fornite raccomandazioni diverse in funzione del quadro clinico (es., per la cardiomiopatia aritmogena il test non è raccomandato – Classe III – quando è presente solo uno dei criteri diagnostici minori, oppure può essere considerato – Classe IIb – quando sono presenti 1 o 2 criteri maggiori).

Raccomandazioni ed Obiettivi Cap.8 d

Da quanto esposto emergono le seguenti priorità, rispetto alle quali sono identificabili i relativi interventi (Tabella 15):

- **Promuovere il ricorso alla diagnosi genetica nei probandi e di programmi organizzati di screening a cascata nei familiari sani.** La disponibilità di sufficienti evidenze scientifiche mette il Sistema Sanitario in condizione di inserire tale screening in modo sistematico nell'ambito dei servizi offerti alla popolazione di riferimento (come definita dalle Linee-guida: v. dopo). Si identifica quindi un intervento di sanità pubblica con le seguenti caratteristiche: basato su valutazioni di efficacia sperimentale; organizzato per profili di assistenza e quindi non soltanto delegato alla competenza /sensibilità/ iniziativa tecnico-professionale; mirato all'equità e quindi basato sul coinvolgimento attivo

della popolazione destinataria; dotato di un esplicito sistema informativo e di valutazione . Sono disponibili LG e raccomandazioni a livello internazionale ma appare comunque utile verificarne la contestualizzazione nel Sistema Sanitario italiano.

- Contestualizzare linee-guida per la il ricorso alla diagnosi genetica nei probandi e dello screening a cascata nei familiari sani. Tale obiettivo può essere conseguito in armonia con il Sistema nazionale linee guida (SNLG) che è impostato per elaborare raccomandazioni di comportamento clinico basate sugli studi scientifici più aggiornati, secondo il proprio metodo; è riconducibile a tale processo anche la collaborazione con società scientifiche ed esperti di settore. In tale framework di livello nazionale potrà essere prodotta una contestualizzazione di una linea-guida. La successiva fase di implementazione è riconducibile alle responsabilità e metodi della programmazione e management dei servizi sanitari regionali e richiede un processo esplicito di recepimento e applicazione
- Organizzazione di un percorso. Assunto che la linea-guida riguarda per definizione la dimensione tecnico-professionale; le raccomandazioni derivate dalla L-G devono portare alla implementazione di un'organizzazione in grado di accogliere la popolazione target in un percorso esplicito, basato su 'nodi organizzativi' chiaramente definiti e procedure di 'ingaggio' precise ed esplicite. Si tratta quindi di definire un PDTA che prenda in carico gli individui destinatari dello screening.

Tabella 15. Interventi identificabili

Argomento: <i>malattie cardiovascolari monogeniche</i>		
	Responsabilità operativa	Indicatori per la valutazione di processo
Intervento 1: <i>Screening 'a cascata' dei familiari di portatori di mutazioni per definite patologie cardiache</i>		
Azioni .		
<ul style="list-style-type: none"> • Contestualizzazione linee-guida 	intervento 'Centrale'	Disponibilità di linee guida contestualizzate alla realtà italiana: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> • Implementare linee-guida 	intervento 'Regionale'	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N
<ul style="list-style-type: none"> • Definire PDTA 	intervento 'Regionale'	Definizione del PDTA da parte della Regione:

		indicatore dicotomico S/N
		<p>Casi trattati all'interno del PDTA:</p> <p>indicatore quantitativo Percentuale sul totale delle prestazioni eseguite in ambito strutture pubbliche/accreditate</p>

8.e Valutazioni economiche

Il quadro generale

Ci sono voluti \$ 1 miliardo e 13 anni per sequenziare la prima bozza del genoma umano. Da quel momento, la tecnologia di sequenziamento si è evoluta e il costo del sequenziamento di un intero genoma è sceso a un tasso che supera la legge di Moore. Il costo di sequenziamento dell'intero genoma è sceso da \$100-\$300 milioni nel 2001 a circa \$ 10 milioni nel 2007. Tale prezzo, però, limitava il sequenziamento solo a laboratori con un'alta competenza, ben finanziati, o a iniziative pubbliche. Nel 2008, grazie a nuove ricerche e all'avanzamento della tecnologia (con strumenti di sequenziamento del DNA di seconda generazione) si è avuta un'accelerazione nella capacità di sequenziamento di interi genomi, ad una velocità di gran lunga superiore a quella sperimentata dall'industria dei semiconduttori e computer. Nel 2009, il costo e la durata del sequenziamento di un intero genoma erano ulteriormente diminuiti, rispettivamente, a \$ 50.000 e due mesi. A maggio 2011, il prezzo per il sequenziamento di interi genomi umani era sceso a \$ 5.000 per genoma. Nel gennaio 2014, una nuova tecnologia ha permesso di sequenziare il genoma umano a un prezzo pari a \$ 1,000 (anche se il prezzo di \$ 1000 non riflette il costo di interpretazione dei dati genomici). Questa cifra rappresenta una soglia importante, una soglia critica di costo che ha posto il sequenziamento in linea con altre indagini diagnostiche avanzate.

Guardando al futuro, quello che si può osservare è che l'innovazione nelle tecnologie e strategie di sequenziamento del genoma non sembra rallentare. Inoltre, i fattori chiave da considerare nello stimare il costo futuro per ottenere una sequenza del genoma umano - in particolare, la quantità di genoma (intero *vs.* esoma), la qualità e l'analisi dei dati associati (se necessaria) – rimarranno probabilmente gli stessi. Ciò dovrebbe portare a pensare che si possa verificare una continua riduzione del costo per il sequenziamento del genoma umano.

Tuttavia, con le piattaforme di sequenziamento già oggi previste nei prossimi anni, la tipologia dei dati di sequenza generati e i costi ad essi associati continueranno ad avere una dinamica molto sostenuta: ci saranno infatti sempre più informazioni, di maggiore qualità, anche se a costi unitari più bassi. Questo comporterà che nei prossimi anni, per quanto si possa immaginare un'ulteriore discesa dei prezzi, la stima del

costo di sequenziamento dipenderà molto dalla velocità con la quale da un lato crescerà la quantità e qualità dei dati di sequenziamento e dall'altra scenderanno i costi unitari.²

Ciò che invece non appare possibile nei prossimi anni è che il costo di integrazione del sequenziamento nella pratica clinica possa seguire i costi di produzione delle sequenze di DNA. Allo stesso modo, vi saranno problemi nel vedere scendere i costi di interpretazione delle varianti genomiche. Infatti, fin tanto che l'interpretazione dipenderà dall'utilizzo di capitale umano altamente qualificato, dato il tasso di nuove varianti che non sarà presente nei database e il tempo necessario per valutare o rivalutare le varianti, sarà improbabile che i costi di interpretazione delle varianti possano scendere allo stesso ritmo dei costi di generare sequenze di DNA. Allo stato attuale, la capacità di raccogliere dati di sequenziamento supera di gran lunga la capacità della comunità medica di interpretare, capire e agire di conseguenza. Le attuali tendenze nelle tecniche di analisi dei big-data e l'avanzamento degli algoritmi di intelligenza artificiale potrebbero portare a sviluppare strumenti di supporto decisionale per aiutare gli operatori sanitari a identificare e gestire al meglio i pazienti con specifiche caratteristiche genetiche. In quel caso, l'IT in campo medico trasformerà la pratica della medicina.

Rimarranno alti anche i costi delle infrastrutture che possono permettere ai clinici di usare il sequenziamento. Infatti, secondo Christensen et al. (2015) la maggior parte dei ragionamenti sui costi di sequenziamento genomico è concentrata sui costi per paziente di sequenziamento, reporting e follow-up medico. Una componente fondamentale che spesso viene trascurata è quella delle esigenze infrastrutturali per il sequenziamento genomico, che sono molto alte. L'interpretazione delle varianti può richiedere ingenti sforzi in termini di strutture, personale, e software, che vanno realizzati *ad hoc* per le esigenze di analisi immediata, per quelle di ri-analisi, e per l'integrazione delle informazioni genomiche con altri tipi di informazioni (tipicamente provenienti da cartelle cliniche). Inoltre, l'archiviazione dei dati, la manutenzione, il trasferimento e il processo di analisi sono tutte attività che hanno bisogno di notevoli risorse, e si prevede che in futuro possano rappresentare una percentuale crescente dei costi complessivi di sequenziamento. Infatti, il corpo umano è costituito da circa 20 trilioni di cellule viventi, ognuna delle quali contiene circa 20.000-22.000 geni che codificano proteine, senza contare quelli che codificano solo per RNA. La quantità di dati che sono stati e saranno prodotti dal sequenziamento, dalla mappatura e dall'analisi dei genomi spingerà facilmente questa branca della medicina nel regno dei *Big Data*. Ogni genoma umano è composto di oltre 3 miliardi di coppie di basi. Ciò equivale a 100.000 *gigabyte* di dati. Il sequenziamento di molti genomi umani farà tranquillamente raggiungere fino a centinaia di *petabyte* di dati (un *petabyte* è 10^{15} byte di informazioni digitali), e i dati creati dall'analisi delle interazioni dei geni moltiplica in modo notevole questi volumi. Queste enormi quantità di dati – unite con altrettante enormi quantità di dati fisiologici, clinici e ambientali raccolti dai sensori indossabili ("*wearable technologies*") – permetteranno ai sistemi sanitari di fornire in modo efficace le cure personalizzate. Tuttavia, sarà anche necessario per il sistema essere in grado di padroneggiare l'arte e la scienza dell'analisi di grandi quantità di dati. Con queste premesse, si potrà anche arrivare a un punto in cui il costo di *re-*

²Nel 2015, lo standard di riferimento per le tecniche di *ultra-high-throughput* WGS corrisponde alla piattaforma HiSeq Xten di Illumina, in grado di generare 10 x 1,8 Tbases in 3,5 giorni, cioè 18.000 genomi umani all'anno (30x). Complete Genomics (una controllata di BGI) ha annunciato il lancio di una piattaforma concorrente *ultra-high-throughput* (chiamata Revolocity) appositamente progettata per applicazioni cliniche (esoma, genoma, RNA-Seq), in grado di sequenziare tra 10.000 (50x) e 30.000 genomi per anno. Nei prossimi 4-5 anni, le nuove tecnologie di terza generazione saranno diventate abbastanza robuste e affidabili da sostituire le attuali per le applicazioni cliniche e diagnostiche. Probabilmente *read-out* diretti e molto lunghi, senza amplificazione (una singola molecola) forniranno informazioni ad alta risoluzione (epigenomics) e informazioni strutturali (aplotipi) da piccole quantità di materiale. Inoltre, la lettura sarà in tempo reale e sarà quindi probabilmente molto veloce.

sequencing dei pazienti diventerà meno costoso della memorizzazione del file contenente le informazioni genetiche per la sua ri-analisi.

Inoltre, non vanno trascurati i costi relativi ai programmi di formazione che sono specifici per le esigenze di sequenziamento genomico. L'evoluzione della tecnologia genomica avrà importanti implicazioni sulla forza lavoro. Sarà necessario avere programmatori e analisti altamente qualificati per interpretare dati complessi. L'aumento dello screening preventivo richiederà molteplici professioni sanitarie (ad esempio dietisti e farmacisti) che saranno coinvolte nel processo di risposta terapeutica del programma di screening. Tuttavia la formazione, assunzione e il mantenimento del personale di laboratorio è visto come una sfida. Vi è una carenza di patologi così come di staff tecnico. Molti medici non genetisti hanno una limitata comprensione della genetica delle malattie di cui si occupano o della genetica in generale. La formazione degli operatori sanitari potrebbe iniziare con l'integrazione della genomica nei programmi di formazione primaria, oltre alla formazione dei professionisti esistenti. Allo stesso modo l'istruzione pubblica dovrebbe intervenire con l'integrazione di corsi di genetica nei curricula della scuola (come fatto per l'informatica). Contemporaneamente, andrebbe cercato un più ampio coinvolgimento della comunità, cui andrebbero spiegati meglio il ruolo, le potenzialità e i limiti di questa branca della scienza medica.

La medicina basata sulla genomica offre l'incredibile promessa e il potere di rivoluzionare la cura clinica, e cambia in modo esponenziale come analizzare le informazioni sanitarie. Quanto fino ad ora presentato deve porre in risalto che la rivoluzione genomica, e la sua integrazione nel sistema sanitario, avranno effetti clinici, etici, sociali ed economici che vanno ben oltre il settore sanitario e coinvolgeranno ampie parti del sistema economico, in particolare quelle ad alto valore aggiunto. E' per questo motivo che in paesi come gli Stati Uniti, il Regno Unito e la Cina negli ultimi anni si sono avviati piani nazionali d'investimento ambiziosi, volti a sviluppare una strategia nazionale capace di sostenere l'industria tecnologica più avanzata. In Europa, paesi quali Estonia, Germania, Olanda e Slovenia hanno iniziato a integrare la medicina genomica all'interno dei loro sistemi sanitari.

Più recentemente, in Francia, è stato proposto un piano nazionale della genomica che ha i seguenti obiettivi: *a)* definire l'importanza del sequenziamento del genoma nella medicina di oggi; *b)* prevedere gli sviluppi che potrebbero essere attesi nel corso dei prossimi dieci anni; *c)* fornire alla Francia una posizione di rilevante importanza nel settore della ricerca genomica; *d)* definire come nei prossimi 10 anni la genomica possa integrarsi negli attuali piani e nelle priorità di assistenza sanitaria, cercando di garantire la coerenza tra l'attività dei medici e le strategie sulle linee di ricerca nazionali; e, infine, *e)* valutare le sfide che la genomica porta in termini di innovazione, capitalizzazione e sviluppo economico, tenendo conto dei vincoli posti dagli aspetti tecnologici e etici.

La complessità del fenomeno e le ricadute che esso potrebbe avere sul paese implicano la necessità di integrare il sistema sanitario con il sistema industriale e con quello della ricerca. Questo è anche il modello dominante che si sta imponendo a livello mondiale, con attività coordinate ad altissimo livello (*"The 100,000 Genomes Plan"* coordinato dal Primo Ministro inglese, o l'iniziativa USA della *"Precision Medicine Initiative"* coordinata dal Presidente Barack Obama). Gli interessi in gioco, le ricadute in termini economici e le aspettative in termini di salute indicano chiaramente come il tema della genomica debba essere affrontato a livello di "sistema-paese" e non, invece, come un fenomeno legato al solo settore sanitario. A testimonianza di ciò, basti considerare che la Gran Bretagna abbia investito 300 milioni di sterline per *"The 100,000 Genomes Plan"* (che in quattro anni sequenzierà 100mila genomi di 70mila pazienti e relativi familiari) e gli Usa abbiano destinato oltre 200milioni di dollari solo per capire come investire nella «Precision Medicine Initiative», con l'obiettivo del sequenziamento di un milione di genomi. Si tratta anche in questo caso di investimenti a fondo

perduto, ma strategici perché in quei Paesi si è capito che la ricerca e l'innovazione nel campo della genomica assicurano sviluppo economico. Come ha ricordato il presidente Obama, ogni dollaro investito nel costoso Progetto Genoma Umano si moltiplica per 140!

I costi della genomica e la sostenibilità per l'SSN

Uno dei potenziali scenari che la rivoluzione genomica sembra aprire è quello di una medicina personalizzata in cui i test genomici saranno in grado di identificare le anomalie clinicamente rilevanti nelle prime fasi del decorso della malattia, guidando così gli operatori verso scelte tempestive ed efficaci. Con la medicina personalizzata si potrà quindi:

- spostare il focus della medicina dalle cure alla prevenzione;
- indirizzare la scelta della terapia ottimale per il paziente e ridurre i tentativi ed errori di prescrizione;
- evitare le reazioni avverse al farmaco;
- aumentare l'aderenza del paziente al trattamento;
- migliorare la qualità della vita del paziente;
- capire meglio gli usi ulteriori o alternativi dei farmaci.

La grande opportunità che la genomica offre è, dunque, la sua capacità di introdurre nuovi modelli scientifici, medici e di *business*. Attraverso l'introduzione della medicina personalizzata si potranno segmentare le popolazioni in gruppi di pazienti con caratteristiche che li legheranno a una maggiore o minore probabilità di rispondere a un particolare trattamento o evitare gli effetti collaterali dello stesso. In tal modo, quello che si cambia non è solo il modo con il quale si sviluppano i farmaci, ma anche la pratica della medicina. Con la diffusione di *ultra-high-throughput sequencing*, un numero sempre più elevato di pazienti potrebbe beneficiare di indagini genomiche di routine: non solo i pazienti affetti da malattie rare e tumori, ma anche quelli con particolari malattie comuni. L'accesso alla medicina genomica rappresenterebbe, quindi, una sfida interessante per la salute pubblica.

Se tutto ciò si realizzasse, si potrebbe quindi immaginare che la medicina "genomicamente informata" aiuterebbe a controllare il costo complessivo delle cure sanitarie, poiché costerà meno e potrà fornire una migliore assistenza lungo tutto l'arco di vita del paziente. Su questo punto, però, i pareri sono in parte discordanti. Infatti, a oggi, lo stato delle cose su questi temi non è ancora del tutto chiaro, non essendo noti molti degli effetti che questa rivoluzione potrà avere a valle dei sistemi sanitari, sia in termini di costi, sia di organizzazione e gestione del sistema.

Da un lato c'è chi sostiene che si possano avere sostanziali risparmi sulla spesa sanitaria in virtù di vari fattori: un numero ridotto di costose e inutili procedure diagnostiche; test più sensibili e più veloci; riduzione di trattamenti farmacologici inefficaci e potenzialmente pericolosi (con la conseguente necessità di dover trattare le reazioni avverse); maggiori benefici sociali ed economici derivanti da un significativo miglioramento della speranza di vita in buona salute. In parallelo, un nuovo quadro industriale innovativo sarà costruito, e sarà fonte di sviluppo economico e di occupazione.

Dall'altro, c'è chi sostiene che questa visione ottimistica del futuro possa essere in qualche modo alterata da una serie di incertezze, tra cui: 1) la reale capacità di identificare variazioni genomiche clinicamente rilevanti nell'intero genoma umano; 2) l'esistenza di errori potenziali sia nell'analisi tecnica che in quella

computazionale³; 3) la capacità di gestire e distribuire le enormi quantità di informazioni derivanti dalla genomica, e la successiva disponibilità di efficaci interventi clinici che possano trovare giovamento da tale analisi genomica; 4) e la capacità di dimostrare che la pratica della medicina genomica possa risultare, nei fatti, una migliore alternativa sia per gli individui, sia per la società, sia per i costi dell'assistenza sanitaria. Inoltre, c'è chi sostiene che anche se il maggiore utilizzo della genetica e della genomica nel settore sanitario ha il potenziale per ridurre le diagnosi errate, eliminare i trattamenti inefficaci e aiutare i pazienti a essere dimessi prima - aspetti che potrebbero rappresentare il beneficio finanziario diretto per il SSN – tutto ciò avrà più effetto sulla qualità della vita dei pazienti che sui costi del SSN. Infatti, con molta probabilità questi saranno in crescita a causa di nuovi investimenti in tecnologie e infrastrutture e di potenziali nuovi servizi sanitari che verranno a crearsi una volta che la genomica sarà disponibile. Inoltre, con la personalizzazione della medicina se da un lato si miglioreranno le cure, dall'altro si renderà sempre meno possibile abbattere i costi su numeri elevati di pazienti, con un aumento dei costi unitari.

Secondo Lu e Cohen (2015) la medicina genomica non sarà uno strumento di contenimento dei costi di per sé, ma piuttosto una rivoluzione con il potenziale per abbassare la curva dei costi dell'assistenza sanitaria. Le promesse di "costo-efficacia" non implicano necessariamente la "riduzione dei costi". Infatti, secondo gli autori, attualmente, non si sa in che modo l'adozione sistematica della medicina genomica nella pratica clinica potrà impattare sui costi sanitari. In una recente rassegna condotta da Phillips et al. (2015), molti test di medicina personalizzata hanno dimostrato di essere "costo-efficaci", anche se pochi sono risultati essere "*cost saving*". Considerando che molti altri test di questo tipo disponibili sul mercato e non sono stati valutati nella rassegna e che tanti sono i nuovi test che stanno arrivando sul mercato, saranno necessari ulteriori dati e studi per capire il valore di tali procedure al fine di informare meglio il processo decisionale e la valutazione delle priorità in genomica.

Recentemente una serie di studi condotti su pazienti in età pediatrica hanno provato a rispondere in modo scientifico a questa domanda. Valencia et al. (2015) hanno effettuato uno studio prospettico in cui hanno ottenuto evidenze a favore dell'utilità diagnostica e clinica del "singleton WES" come un test di sequenziamento di primo livello per i bambini con un sospetto di disturbo monogenico. Il costo-efficacia del WES è stato facilmente dimostrato mettendo a confronto i costi del WES con quelli sostenuti fino a quel punto nell'odissea diagnostica affrontata dai pazienti. Inoltre, è stato dimostrato che, in alcuni casi, può essere più conveniente eseguire il WES fin dall'inizio. Stark et al. (2016) hanno, invece, valutato in modo prospettico l'utilità diagnostica e clinica di Singleton WES come test di primo livello nei bambini con sospetta malattia monogenica. Di 80 bambini arruolati, 46 hanno ricevuto una diagnosi genetica molecolare attraverso Singleton WES (57,5%) rispetto ai 11 (13,75%) che ha subito le indagini standard, nello stesso gruppo di pazienti. La gestione clinica è cambiata dopo la diagnosi in 15 dei 46 partecipanti con diagnosi (32,6%). Dodici genitori hanno ricevuto una diagnosi genetica a seguito di test a cascata, e 28 coppie sono state identificate come ad alto rischio di recidiva nelle gravidanze future. Il "singleton WES" ha ottenuto risultati migliori rispetto alle procedure standard sia in termini di tasso di diagnosi, sia di benefici dall'aver una diagnosi certa, vale a dire, l'impatto sulla gestione del bambino e una maggiore chiarezza immediata sui rischi della riproduzione per la

³ Secondo Sohn (2016), nonostante le molte storie di successo nel fornire le giuste diagnosi, ben il 75% dei pazienti con sospette malattie genetiche non riesce a ottenere risposte, anche dopo il sequenziamento. Uno dei motivi è che essere in grado di leggere il codice non è sufficiente - la parte più difficile è la sua interpretazione. Diversi gruppi spesso forniscono analisi contrastanti dello stesso genoma. In uno studio recente, nove laboratori diagnostici hanno analizzato 99 anomalie genetiche: i laboratori hanno concordato sui risultati solo un terzo delle volte. Dopo ampia discussione e successive revisioni, il livello di accordo è aumentato, ma solo al 71%.

famiglia allargata. Secondo lo studio il WES è riuscito a ridurre a circa un terzo i costi delle indagini (da 25.000 dollari a 9.000 dollari per paziente se WES è fatta subito).

La conclusione che è possibile trarre da questa breve rassegna dell'effetto sui costi per l'SSN della rivoluzione genomica è che nei prossimi anni la genomica non porterà a un calo dei costi in sanità. Ciò che, invece, ci si dovrà aspettare è una riduzione dei costi per anno di vita guadagnato e passato in buona salute (*Quality Adjusted Life Year - QALY*). Questa conclusione è supportata principalmente dalla storia delle scoperte in medicina e dal loro riflesso in termini di costi sui sistemi sanitari. Negli anni, molte delle attuali tecniche e delle conoscenze, che oggi sono solo agli albori, miglioreranno e aumenteranno, permettendo di abbassare i costi unitari. Abbiamo, quindi, un ampio motivo di essere fiduciosi che la vitalità economica della medicina genomica sarà stabilita nei prossimi 5 anni, ma la difficoltà di questa sfida non deve essere sottovalutata.

Lo scenario dei costi

Fatte queste premesse, qui di seguito è presentato un semplice schema che permettere di stimare i costi di esercizio legati alla fornitura di una serie di servizi di genomica, così come ipotizzato nel "*France Genomic Medicine Plan 2025*". In termini di assistenza l'obiettivo del piano è di ottenere l'integrazione della medicina genomica nel percorso di cura e la gestione delle malattie comuni. Ciò significa realizzare, entro il 2025, un percorso di cure primarie con la medicina genomica per tutti i pazienti francesi affetti da tumore, o da una malattia rara o da una malattia comune, dando alcune priorità per speciali patologie. Entro il 2020, il sistema dovrebbe sequenziare circa 235.000 genomi ogni anno. Oltre tale data il sistema sarà ampliato per coprire tutte le malattie comuni.

Nella Tabella 16, sono riportate una serie di stime preliminari per permettere di capire quale potrebbe essere l'impatto di breve-medio periodo dell'introduzione su una più ampia scala delle attività di genomica in Italia. La prima colonna riproduce lo scenario al 2020 applicato nel piano della genomica francese. I dati di costo del piano francese sono ottenuti partendo da un costo medio di sequenza di € 1690.

Le colonne dalla 2 alla 4 rappresentano, invece, potenziali scenari applicabili all'Italia tra il 2017 e il 2025. I dati di domanda di servizi di genomica sono stati ottenuti guardando alle stime francesi e considerando le incidenze di nuovi tumori e il numero di malattie rare esistenti in Italia. In particolare, il numero di analisi per paziente da fare è stato ottenuto considerando 3 sequenziamenti per le malattie rare (1 per il paziente e 2 per i genitori), un sequenziamento per le malattie comuni e 3 per i tumori (1 per il paziente, uno per le metastasi e 1 per la biopsia liquida). Il costo del sequenziamento è stato ipotizzato pari a quello francese.⁴

Il quadro complessivo che si ottiene in termini di costi annui è riportato nella sezione 4 della Tabella 16. Sulla base delle ipotesi fatte, il *budget impact* per l'Italia potrebbe variare da un minimo di 845 a un massimo di

⁴ La scelta di considerare il costo unitario francese come "costo standard" per l'Italia deriva dall'assenza in Italia, al momento, di un piano sulla concentrazione di piattaforme di analisi per milione di popolazione. Il costo unitario (e il livello della qualità) deriva dal definire il numero medio di indagini attese per piattaforma. Nel caso previsto dallo scenario italiano, 680.000 indagini genomiche /anno, queste possono essere eseguite in 100 laboratori ognuno con 6.800 indagini, oppure in 10 (che è il numero delle piattaforme previste nel piano francese), con un numero medio di indagini pari a 68.000. Ovviamente, in questo secondo caso i costi saranno più bassi. La definizione di questi aspetti rimane cruciale per la valutazione degli impatti economici.

2,298 milioni di euro/anno, a seconda del numero di pazienti trattati. Nella sezione 5 sono, invece, riportati i dati cumulativi per un quinquennio.

Va chiarito che questi costi fanno riferimento alla sola fase di indagine (diagnostica) e non includono eventuali costi legati alla terapia, né considerano risparmi provenienti da riduzione di altri accertamenti. Vanno quindi considerato come una stima dei costi aggiuntivi dovuti all'introduzione delle analisi genomiche in Italia. Occorre inoltre evidenziato che lo scenario previsto al 2025 prevede la somministrazione di test genetici completi ad una popolazione di 680.000 individui, un numero che potrebbe includere tutti i circa 500.000 nuovi nati in un anno in Italia (e per i quali le informazioni del genoma sono quelle più durature e quindi di maggiore investimento), ed avere a disposizione altri 180.000 test da somministrare ad altri pazienti. Una tale considerazione potrebbe aprire un utile dibattito sulle priorità in termini di effettuazione delle analisi genetiche: fino a che punto può essere utile definire strategie di analisi per sotto-campioni della popolazione? Può avere senso analizzare un paziente ultra-sessantenne con tumore o una malattia complessa?

Tabella 16. Stima dei costi della genomica per il SSN in Italia

	1	2	3	4
Numero di pazienti target	Scenario francese 2020	Scenario italiano 2017	Scenario italiano 2020	Scenario italiano 2025
1. Tumori (*)	110.000	100.000	110.000	300.000
2. Malattie rare (*)	45.000	40.000	45.000	100.000
3. Malattie comuni	80.000	80.000	80.000	160.000
Totale	235.000	220.000	235.000	560.000
Eq WGS X10/anno				
1. Tumori (3,2 Eq WGS)	3,2	3,0	3,0	3,0
2. Mal. rare (1 paziente + 2 genitori)	3,0	3,0	3,0	3,0
3. Mal. comuni (1 paziente)	3,0	1,0	1,0	1,0
1. N. di campioni per tumori	352.000	300.000	330.000	900.000
2. N. di campioni per mal. rare	135.000	120.000	135.000	300.000
3. N. di campioni per mal.comuni	240.000	80.000	80.000	160.000
Num. Totale analysi WGS Equ/anno	727.000	500.000	545.000	1.360.000
Costo medio sequen. WGS	1.690	1.690	1.690	1.690
Costi unitari (Euro)				
1. Tumori	5.409	5.071	5.071	5.071
2. Malattie rare	5.071	5.071	5.071	5.071
3. Malattie comuni	5.071	1.690	1.690	1.690
Budget Impact analysis (Mil. Euro/anno)				
1. Tumori	595,0	507,1	557,8	1.521,3

2. Malattie rare	228,2	202,8	228,2	507,1
3. Malattie comuni	405,7	135,2	135,2	270,4
Total impact	1.228,8	845,2	921,2	2.298,8
Budget Impact analysis su 5 anni (Mil. Euro)				
1. Tumori	2.974,9	2.535,5	2.789,0	7.606,4
2. Malattie rare	1.141,0	1.014,2	1.141,0	2.535,5
3. Malattie comuni	2.028,4	676,1	676,1	1.352,2
Total impact	6.144,2	4.225,8	4.606,1	11.494,0
(*) Al fine di porre meglio in contesto queste stime è utile considerare che ogni anno ci sono circa 360.000 nuovi casi di tumore (Fonte: AIRCS. http://www.airc.it/cancro/cos-e/statistiche-tumori-italia/#p1) e sono circa 2 milioni i pazienti affetti da malattie rare in Italia (70% bambini età pediatrica). Fonte: OMAR. http://www.osservatoriomalattierare.it/malattie-rare				

Bibliografia

1. Parere «Gestione degli incidental findings nelle indagini genomiche con le nuove piattaforme tecnologiche». Comitato Nazionale per la Bioetica. 17 Marzo 2016.
2. R.C. Green, J.S. Berg and W.W. Grody et al. for the American College of Medical Genetics and Genomics, Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing, "Genetics in Medicine", 2013, 15, no. 7, pp. 565-574
3. Parere «Biobanche pediatriche». Comitato Nazionale per la Bioetica. 11 Aprile 2014
4. Borry P, Cornel MC, Howard HC. Where are you going, where have you been: a recent history of the direct-to-consumer genetic testing market. J Community Genet. 2010 Sep;1(3):101-106
5. Shehata J, Kooijman E, Ianuale C. Ethical implications and legislative control of direct-to-consumer genetic testing in Europe. IJPH 2012; 9:12-14.
6. Mavroidopoulou V, Xera E, Mollaki V. Awareness, attitudes and perspectives of direct-to-consumer genetic testing in Greece: a survey of potential consumers. J Hum Genet. 2015; 60, 515-523
7. Agurs-Collins T, Ferrer R, Ottenbacher A, Waters EA, Mary E. O'Connell,1 and Jada G. Hamilton Public Awareness of Direct-to-Consumer Genetic Tests: Findings from the 2013 U.S. Health Information National Trends Survey. J Cancer Educ. 2015 ; 30(4): 799-807
8. Covolo L, Rubinelli S, Ceretti E, Gelatti U. Internet-Based Direct-to-Consumer Genetic Testing: A Systematic Review. J Med Internet Res 2015;17(12):e279
9. Hogarth S, Javitt G, Melzer D. The current landscape for direct-to-consumer genetic testing: legal, ethical, and policy issues. Annu Rev Genomics Hum Genet 2008; 9:161-182.
10. US Food and Drug Administration (2015) FDA permits marketing of first direct-to-consumer genetic carrier test for Bloom syndrome. Available at: www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm435003.htm.
11. Slokenberga S. Direct-to-consumer Genetic Testing: Changes in the EU Regulatory Landscape. Eur J Health Law [Internet]. 2015;22(5):463-80.
12. Borry P. Direct-to-consumer genetic testing : from ethical concerns to policy answers. 2013;6(3):114-7
13. Kalokairinou L, Howard HC, Borry P. Current developments in the regulation of direct-to-consumer genetic testing in Europe. Med Law Int [Internet]. 2015;15(2-3):97-123.

14. Rafiq M, Ianuale C, Ricciardi W, Boccia S. Direct-to-consumer genetic testing: a systematic review of European guidelines, recommendations, and position statements. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2015 Oct;19(10):535-47
15. Borry P, van Hellemond RE, Sprumont D, Fittipaldi C, Jales D, Rial-Sebbag E, Spranger TM, Curren L, Kaye J, Nys H, Howard H. Legislation on direct-to-consumer genetic testing in seven European countries *Eur J Hum Genet*. 2012; 20(7): 715–721.
16. Hellemond RE Van, Hendriks AC, Breuning MH, Calsbeek H, Mellitus D, Society N, et al. Regulating the Use of Genetic Tests: Is Dutch Law an Example for Other Countries With Regard To Dtc Genetic Testing? *Amsterdam Law Forum*. 2010)
17. Webborn N, Williams A, McNamee M, Bouchard C, Pitsiladis Y, Ahmetov I, et al. Direct-to-consumer genetic testing for predicting sports performance and talent identification: Consensus statement. *Br J Sports Med [Internet]*. 2015;49(23):1486–91).
18. Vrekar I, Peterlin B, Teran N, Lovrecic L. Direct-to-consumer genetic testing in Slovenia: availability, ethical dilemmas and legislation. 2015;84–9
19. Kechagia S, Mai Y, Vidalis T, Patrinos G.P., Vayena E. Personal Genomics in Greece: An Overview of Available Direct-to-Consumer Genomic Services and the Relevant Legal Framework. *Public Health Genomics* 2014;17:299-305
20. Melzer D, Hogarth S, Liddell K, Ling T, Sanderson S, Zimmern RL. Genetic tests for common diseases: new insights, old concerns. *BMJ* 2008; 336:590–593.
21. Wright CF, Hall A, Zimmern RL. Regulating direct-to-consumer genetic tests: what is all the fuss about? *Genet Med* 2011; 13:295–300.
22. Veenstra DL, Piper M, Haddow JE, Pauker SG, Klein R, Richards CS, Tunis SR, Djulbegovic B, Marrone M, Lin JS, Berg AO, Calonge N. Improving the efficiency and relevance of evidence-based recommendations in the era of whole genome sequencing: an EGAPP methods update. *Genet Med* 2013; 15:14–24.
23. European Academies Science Advisory Council (2012) Direct-to-consumer genetic testing for health-related purposes in the European Union. Available at: www.easac.eu/fileadmin/Reports/EASAC_Genetic_Testing_Web_complete.pdf, accessed April 26, 2015.
24. Scheuner MT, Sieverding P, Shekelle PG. Delivery of genomic medicine for common chronic adult diseases: a systematic review. *JAMA*. 2008 Mar 19;299(11):1320-34
25. Wright CF, Gregory-Jones S. Size of the direct-to-consumer genomic testing market. *Genet Med* 2010; 12:594
26. Howard HC, Borry P. Direct-to-consumer genetic testing: more questions than benefits? *Per Med* 2008; 5:317–320.
27. Borry P, Howard HC, Sénécal K, Avard D. Direct-to-consumer genome scanning services. Also for children? *Nat Rev Genet* 2009; 10:8.
28. Borry P, Howard HC, Sénécal K, Avard D. Health-related direct-to-consumer genetic testing: a review of companies' policies with regard to genetic testing in minors. *Fam Cancer* 2010; 9:51–59.
29. Howard HC, Knoppers BM, Borry P (2010) Blurring lines. *EMBO Rep* 11:579–582.
30. European Parliament, Directorate General for Internal Policies (2013) DTC GT; Science and Technology Options Assessment Annual Report 2012. Available at: www.europarl.europa.eu/stoa/webdav/site/cms/shared/4_publications/annual_reports/STOA_Annual_Report_2012.pdf, accessed April 26, 2015.

31. <https://www.genome.gov/12011238>
32. Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., and Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308(5278): 1635-1638.
33. Martins dos Santos V, Müller M, de Vos WM. Systems biology of the gut: the interplay of food, microbiota and host at the mucosal interface. *Curr Opin Biotechnol* 2010; 21:539–50.
34. Salonen A, de Vos WM, Palva A. Gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: present state and perspectives. *Microbiology*. 2010;156(Pt11):3205-15. Epub 2010 Aug 12.
35. Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*. 2008 Nov;57(11):1605-15. Boojink et al., 2007.
36. Chadeau-Hyam M, Ebbels TM, Brown IJ, Chan Q, Stampler J, Huang CC, Daviglius ML, Ueshima H, Zhao L, Holmes E, Nicholson JK, Elliott P, De Iorio M. Metabolic profiling and the metabolome-wide association study: significance level for biomarker identification. *J Proteome Res*. 2010; 9(9):4620-7.
37. Martin FP, Sprenger N, Montoliu I, Rezzi S, Kochhar S, Nicholson JK. Dietary modulation of gut functional ecology studied by fecal metabolomics. *J Proteome Res*. 2010;9(10):5284-95.
38. Vitali B, Ndagijimana M, Cruciani F, Carnevali P, Candela M, Guerzoni ME, Brigidi P. Impact of a synbiotic food on the gut microbial ecology and metabolic profiles. *BMC Microbiol*. 2010;10:4.
39. Saric J, Wang Y, Li J, Coen M, Utzinger J, Marchesi JR, Keiser J, Veselkov K, Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. Species variation in the fecal metabolome gives insight into differential gastrointestinal function. *J Proteome Res*. 2008;7(1):352-60. Epub 2007 Dec 1.
40. Del Chierico F, Vernocchi P, Petrucca A, Paci P, Fuentes S, Praticò G, Capuani G, Masotti A, Reddel S, Russo A, Vallone C, Salvatori G, Buffone E, Signore F, Rigon G, Dotta A, Miccheli A, de Vos WM, Dallapiccola B, Putignani L. Phylogenetic and Metabolic Tracking of Gut Microbiota during Perinatal Development. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137347.
41. Del Chierico F, Nobili V, Vernocchi P, Russo A, De Stefanis C, Gnani D, Paci P, Dallapiccola B, Alisi A, Putignani L. Gut microbiota profiling of pediatric NAFLD/obese patients unveiled by an integrated metabolomics based approach, *Hepatology* 2016, Accepted
42. Li H, Xie Z, Lin J, Song H, Wang Q, Wang K, Su M, Qiu Y, Zhao T, Song K, Wang X, Zhou M, Liu P, Zhao G, Zhang Q, Jia W. Transcriptomic and metabolomic profiling of obesity-prone and obesity-resistant rats under high fat diet. *J Proteome Res*. 2008;7(11):4775-83. Epub 2008 Oct 2.
43. Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(5):431-8
44. Young SP, Wallace GR. Metabolomic analysis of human disease and its application to the eye. *J Ocul Biol Dis Infor*. 2009;2(4):235-242.
45. Ackerman MJ et al. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart Rhythm*. 2011 Aug;8(8):1308-39.
46. Priori SG et al. Executive summary: HRS/EHRA/APQRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes. *Heart Rhythm*. 2013 Dec;10(12):e85-108.
47. Beckmann, J.S. Can we afford to sequence every newborn baby's genome? *Hum. Mutat*. 2015, 36, 283–286.

48. Bio-IT World Staff. Illumina announces \$5,000 genome pricing. Bio IT News. May 9, 2011.
49. Christensen C.D., Dukhovny D., Siebert U., and Green R.C., Assessing the Costs and Cost-Effectiveness of Genomic Sequencing, *Journal of Personalized Medicine* 2015, 5, 470-486; doi:10.3390/jpm5040470
50. Christensen, K.D.; Vassy, J.L.; Jamal, L.; Lehmann, L.S.; Slashinski, M.J.; Perry, D.L.; Robinson, J.O.; Blumenthal-Barby, J.; Feuerman, L.Z.; Murray, M.F.; et al. Are physicians prepared for whole genome sequencing? A qualitative analysis. *Clin. Genet.* 2015 doi:10.1111/cge.12626.
51. Crawford J.M. and Aspinall M.G., The business value and cost-effectiveness of genomic medicine. *Personalized Medicine* (2012) 9(3), 265–286.
52. Demmer, L.A.; Waggoner, D.J. Professional medical education and genomics. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2014, 15, 507–516.
53. France Médecine Génomique 2025
http://www.gouvernement.fr/sites/default/files/document/document/2016/06/22.06.2016_remise_du_rapport_dyves_levy_-_france_medecine_genomique_2025.pdf
54. Hayden, E.C. Technology: The \$1000 genome. *Nature* 2014, 507, 294–295.
55. Hegde, M.; Bale, S.; Bayrak-Toydemir, P.; Gibson, J.; Bone Jeng, L.J.; Joseph, L.; Laser, J.; Lubin, I.M.; Miller, C.E.; Ross, L.F.; et al. Reporting incidental findings in genomic scale clinical sequencing—A clinical laboratory perspective: A report of the Association for Molecular Pathology. *J. Mol. Diagn.* 2015, 17, 107–117.
56. Goh V, Helbling D, Biank V, et al. Next generation sequencing facilitates the diagnosis in a child with twinkle mutations causing cholestatic liver failure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011. (E-pub ahead of print)
57. Korf, B.R.; Berry, A.B.; Limson, M.; Marian, A.J.; Murray, M.F.; O'Rourke, P.P.; Passamani, E.R.; Relling, M.V.; Tooker, J.; Tsongalis, G.J.; et al. Framework for development of physician competencies in genomic medicine: Report of the Competencies Working Group of the Inter-Society Coordinating Committee for Physician Education in Genomics. *Genet. Med.* 2014, 16, 804–809.
58. Lu C.Y. and Cohen J.P. (2015), Can Genomic Medicine Improve Financial Sustainability of Health Systems? *Molecular Diagnosis & Therapy.* April 2015, Volume 19, Issue 2, pp 71–77
59. Mardis, E. Anticipating the \$1000 genome. *Genome Biol.* 2006, doi:10.1186/gb-2006-7-7-112.
60. Mardis E. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature* 2011, 470: 198-203.
61. Metzker M. Sequencing technologies - the next generation. *Nature Genetics* 2010, 11: 31-46. [PubMed]
62. National Institutes of Health's Office of Extramural Research. Revolutionary Genome Sequencing Technologies, RFA-HG-08-009. NIH web site. (Available at. <http://grants1.nih.gov/grants/guide/rfa-files/RFA-HG-08-009.html>)
63. Neumann, P. J., J. T. Cohen, and M. C. Weinstein. 2014. Updating cost-effectiveness: The curious resilience of the \$50,000-per-QALY threshold. *New England Journal of Medicine* 371(9):796–797.
64. Phillips K.A., Sakowski J.A., Trosman J., Douglas M.P., Liang S.Y., and Neumann P., (2014), The economic value of personalized medicine tests: what we know and what we need to know. *Genet Med.*, March ; 16(3): 251–257. doi:10.1038/gim.2013.122.
65. Robson, M.E.; Bradbury, A.R.; Arun, B.; Domchek, S.M.; Ford, J.M.; Hampel, H.L.; Lipkin, S.M.; Syngal, S.; Wollins, D.S.; Lindor, N.M. American society of clinical oncology policy statement update: Genetic and genomic testing for cancer susceptibility. *J. Clin. Oncol.* 2010, 28, 893–901.
66. Sohn E., (2016) Diagnosis: A clear answer, in OUTLOOK: PRECISION MEDICINE *Nature*, VOL 537, S65.
67. Stark Z., Tan T.Y., Chong B., et al. (2016). A prospective evaluation of whole-exome sequencing as a first-

- tier molecular test in infants with suspected monogenic disorders, *Genetics in Medicine* 18, 1090–1096 doi:10.1038/gim.2016.1
68. Stein L. The case for cloud computing in genome informatics. *Genome Biology* 2010, 11: 207-213.
 69. Valencia A.C., Husami A., Holle J., et al. (2015). Clinical impact and cost-effectiveness of whole exome sequencing as a diagnostic tool: a pediatric center's experience. *Frontiers in Pediatrics*, 1 August 2015. Vol. 3, Article 67, pp.1-15.
 70. Veenstra, D. L., and P. J. Brooks. 2015. The cost-effectiveness of clinical sequencing. Discussion Paper, Institute of Medicine, Washington, DC. <http://nam.edu/wp-content/uploads/2015/06/CostEffectiveness>.
 71. Wade N. Cost of decoding a genome is lowered. *New York Times*. August 10, 2009.
 72. Wetterstrand KA. DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP) Available at: www.genome.gov/sequencingcostsdata. Accessed [20 Nov 2016].
 73. Wolinsky H. The thousand-dollar genome: Genetic brinkmanship or personalized medicine? *EMBO Reports*. 2007; 8(10):900-3.
 74. Worthey EA. Making a definitive diagnosis: successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet Med*. 2011; 13(3):255-62.

CAPITOLO 9

OBIETTIVI e RACCOMANDAZIONI

Nelle tabelle del paragrafo 9.a è presentata una visione sintetica e sinottica degli obiettivi, azioni e indicatori di processo; nei rispettivi capitoli sono espresse le evidenze scientifiche di supporto e le argomentazioni che hanno determinato la loro formulazione al fine di favorire una loro più compiuta comprensione e valutazione.

In considerazione del prevedibile impatto sulla organizzazione dei servizi sanitari regionali, la definizione dei previsti PDTA, piani di implementazione, registri e regolamenti, sarà adottata con atti di intesa con la Conferenza Stato-Regioni e Province autonome di Trento e di Bolzano, così come stabilito nell'art. 1 comma 2 della presente Intesa.

Nel paragrafo 9.b sono espresse le raccomandazioni trasversali ritenute dirimenti per un pieno perseguimento degli scopi finali del presente Piano, per un rafforzamento dell'implementazione dei suoi obiettivi e che è opportuno che i programmatori, le autorità del sistema sanitario, i professionisti e i cittadini pongano al centro della loro attenzione.

9.a Sintesi degli obiettivi

Macroarea 1: La genomica nella diagnosi				
Area	Obiettivi	Azioni	Prevalente responsabilità	Indicatori di processo/output
Malattie Mendeliane (rif Cap 3 a)	Programmazione dell'implementazione e dell'eventuale potenziamento delle capacità di sequenziamento	Condurre survey delle competenze e delle tecnologie	Centrale	Disponibilità di risultati della survey: indicatore dicotomico S/N
		Definire un piano di implementazione	Centrale/Regionale	Definizione del piano: indicatore dicotomico S/N Percentuale sul totale delle regioni dei piani regionali implementati in ambito strutture pubbliche/accreditate
	Rendere disponibili linee guida per l'utilizzo del sequenziamento	Definire linee-guida	Centrale	Disponibilità di linee-guida: indicatore dicotomico S/N
		Implementazione linee-guida	Regionale	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N
Malattie Complesse e	Garantire l'uso appropriato dei	Definire linee guida per l'uso dei	Centrale	Disponibilità di linee-guida:

multifattoriali (rif Cap 3 b)	polimorfismi nella pratica clinica	polimorfismi nella pratica clinica		indicatore dicotomico S/N
		Implementazione linee-guida	Regionale	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N
	Aggiornare le linee-guida	programmare un rapporto periodico di aggiornamento delle linee-guida	Centrale	Disponibilità almeno annuale del report: indicatore dicotomico S/N
Tumori Mutazioni germinali (rif Cap 3 c i)	Vedi cap- 4.3.i Cap. 5.b			
Tumori Mutazioni somatiche (rif Cap 3 c ii)	Rendere disponibili linee guida per l'utilizzo appropriato dei test per mutazioni somatiche	Definire linee-guida	Centrale	Disponibilità di linee-guida: indicatore dicotomico S/N
		Implementare linee-guida	Regionale	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N
	Aggiornare le linee-guida	programmare un rapporto periodico di aggiornamento delle linee-guida	Centrale	Disponibilità almeno annuale del report: indicatore dicotomico S/N

Macroarea 2: La prevenzione personalizzata				
Area	Obiettivi	Azioni	Prevalente responsabilità	Indicatori di processo/output
Test Pre-concezionali (rif. Cap 4a)	Programmazione dell'Implementazione delle piattaforme NGS	V sopra	V sopra	V sopra
	Screening evidence-based dei portatori di mutazioni genetiche responsabili di malattie recessive comuni	Definire linee guida	Centrale	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
		Implementazione linee-guida	Regionale	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N
		Definire PDTA	Regionale	Definizione del PDTA da

				parte della Regione: indicatore dicotomico /N
				Casi trattati all'interno del PDTA: indicatore quantitativo Percentuale sul totale delle prestazioni eseguite in ambito strutture pubbliche/accreditate
	Progetto pilota di screening dei portatori di geni associati a molte malattie genetiche	Definire linee- guida	Centrale	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
		Attuare progetto/i pilota	Centrale/Regionale.	Attuazione di almeno uno studio pilota: indicatore dicotomico S/N

Macroarea 2: La prevenzione personalizzata (segue)				
Area	Obiettivi	Azioni	Prevalente responsabilità	Indicatori di processo/output
Test Prenatali (rif Cap 4 b)	Promuovere la diffusione della diagnosi prenatale non invasiva sul DNA fetale presente nel circolo materno (NIPT)	Definire PDTA	Regionale	Definizione del PDTA da parte della Regione: indicatore dicotomico S/N
				Casi trattati all'interno del PDTA: indicatore quantitativo Percentuale sul totale delle prestazioni eseguite in ambito strutture pubbliche/accreditate
	Definizione di percorsi per diagnosi prenatale genomica (NGPD)	Definire linee- guida	Centrale	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
		Implementare linee guida	Regionale	Recepimento regionale Linee- guida: indicatore dicotomico S/N
		Definire PDTA	Regionale	Definizione del PDTA da parte della Regione: indicatore

				dicotomico S/N
				Casi trattati all'interno del PDTA: indicatore quantitativo percentuale sul totale delle prestazioni eseguite in ambito strutture pubbliche/accreditate
Screening neonatale (rif Cap 4 c)	Diffusione dell'uso delle tecnologie di NGS nei test di conferma diagnostica (II livello)	Atti di indirizzo/ programmazione	Regionale	Disponibilità di atti regionali: indicatore dicotomico S/N
				% di centri di conferma diagnostica che utilizzano tecnologie NGS
	Presenza in carico per screening "esteso" dei neonati	Definizione linee-guida per la presa in carico	Centrale	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
		Definire percorso di presa in carico	Regionale	Definizione del PDTA da parte della Regione: indicatore dicotomico S/N
				Casi trattati all'interno del PDTA: indicatore quantitativo Percentuale sul totale delle prestazioni eseguite in ambito strutture pubbliche/accreditate

Macroarea 2: La prevenzione personalizzata (segue)				
Test postnatali (rif Cap 8d)				
Area	Obiettivi	Azioni	Prevalente responsabilità	Indicatori di processo/output
Malattie Mendeliane (cardiovascolari monogeniche) (rif Cap 8 d 1 ii)	Screening "a cascata" dei familiari di portatori di mutazioni per definite patologie cardiache	Contestualizzazione linee-guida	Centrale	Disponibilità di linee guida contestualizzate alla realtà italiana: indicatore dicotomico S/N
		Implementare linee guida	Regionale	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N

		Definire PDTA	Regionale	Definizione del PDTA da parte della regione: indicatore dicotomico S/N
				Casi trattati all'interno del PDTA: indicatore quantitativo Percentuale sul totale delle prestazioni eseguite in ambito strutture pubbliche/accreditate
Malattie Complesse cardiovascolari multifattoriali (rif Cap 4 d 2 ii)	Promuovere il ricorso alla valutazione della suscettibilità genetica nei pazienti con CVD e di un programma organizzato di screening del GRS nei familiari sani	Definire linee-guida	Centrale	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
		Implementare linee guida	Regionale	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N
		Definire PDTA	Regionale	Definizione del PDTA da parte della Regione: indicatore dicotomico S/N
				Casi trattati all'interno del PDTA: indicatore quantitativo Percentuale sul totale delle prestazioni eseguite in ambito strutture pubbliche/accreditate
Tumori (Mutazioni germinali per tumori ereditari) (rif. Cap 4 d 3)	Terapia preventiva per donne a rischio moderatamente aumentato o ad alto rischio di tumore della mammella	Contestualizzare linee-guida	Centrale	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
		Implementare linee-guida	Regionale	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N
	Offrire percorsi di mastectomia profilattica e Ooforectomia profilattica (comprensivamente dell'eventualità di Terapia ormonale sostitutiva)	Contestualizzare linee-guida	Centrale	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
		Implementare linee-guida	Regionale	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N
		Definire PDTA	Regionale	Definizione del PDTA da parte della Regione: indicatore dicotomico S/N
				Casi trattati all'interno del

				PDTA: indicatore quantitativo Percentuale sul totale delle prestazioni eseguite in ambito strutture pubbliche/accreditate
Organizzare percorsi di prevenzione primaria per i pazienti portatori, o familiari per mutazione per colon/Lynch, comprensivamente della prevenzione di carcinomi extra- colon.	Contestualizzare linee-guida	Centrale	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N	
	Implementare linee- guida	Regionale	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N	
	Definire PDTA	Regionale	Definizione del PDTA da parte della Regione: indicatore dicotomico S/N	
			Casi trattati all'interno del PDTA: indicatore quantitativo Percentuale sul totale delle prestazioni eseguite in ambito strutture pubbliche/accreditate	
Promuovere la terapia preventiva con aspirina nella sindrome di Lynch	Contestualizzare linee-guida	Centrale	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N	
	Implementare linee- guida	Regionale	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N	
Promuovere l'utilizzo del test genetico per mutazioni germinali nel cancro alla prostata	Contestualizzare linee-guida	Centrale	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N	
	Implementare linee- guida	Regionale	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N	

Macroarea 3: La genomica nella terapia

Area	Obiettivi	Azioni	Prevalente responsabilità	Indicatori di processo/output
------	-----------	--------	------------------------------	----------------------------------

Risposta ai farmaci e farmacogenomica (rif cap. 5 a)	Promuovere un consenso sui parametri necessari a stabilire l'utilità clinica dei test basati su informazioni farmacogenomiche	Definire un documento di consenso	Centrale	Disponibilità del documento di consenso: indicatore dicotomico S/N
	Promuovere l'utilizzo più integrato delle valutazioni farmacogenetiche nella pratica clinica	Definire linee guida	Centrale	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
		Implementare linee-guida	Regionale	Recepimento regionale Linee-guida : indicatore dicotomico S/N
	Costituzione di un registro dei casi di farmacogenomica	redazione di un regolamento	Centrale	Disponibilità di regolamento nazionale approvato dal Garante: indicatore dicotomico S/N
		Implementare registri regionali	Regionale	Costituzione di un Registro regionale: % dei Registri regionali implementati
Terapia personalizzata dei tumori (rif cap 5 b)	Rendere disponibili linee guida per l'uso appropriato della genomica nella valutazione della prognosi e nella terapia dei tumori (mammella, ovaio, polmone, colonretto)	Definire linee guida	Centrale	Disponibilità di linee guida: indicatore dicotomico S/N
		Implementare linee-guida	Regionale	Recepimento regionale Linee-guida: indicatore dicotomico S/N

Macroarea 4: Funzione di governo centrale e azioni di supporto alla implementazione del piano (Rif. Cap. 6)				
Area	Obiettivi	Azioni	Prevalente responsabilità	Indicatori di processo/output
struttura di governance	stabilizzazione della governance	Emanazione decreti attuativi	Centrale	indicatore dicotomico S/N

		Emanazione regolamenti	Centrale	indicatore dicotomico S/N
gestione dell'innovazione	Implementare meccanismi per l'innovazione delle policy	conferenza periodica sull'innovazione basata sulla genomica	Centrale	Almeno una conferenza l'anno: indicatore dicotomico S/N
		attivazione di progetti-pilota o di fattibilità	Centrale	% dei progetti (proposti dalla conferenza sulla innovazione) implementati

Macroarea 5: Indicazioni per la ricerca e l'innovazione (Rif. Cap. 7)				
Topic	Obiettivi	Azioni	Prevalente responsabilità	Indicatori di processo/output
I. Big data e medicina computazionale	Conseguire un'autonoma (non autarchica) capacità di collezionare dati ed integrarli, generando informazioni di impatto preventivo e clinico	Costituire network di risorse computazionali	Centrale	indicatore dicotomico S/N
	Implementare un sistema di HTA dedicato	Costituire un network con Hub in ISS (v Cap 6)	Centrale	indicatore dicotomico S/N
	Rendere fruibili le informazioni che si rendano disponibili per il loro potenziale utilizzo nel contesto del Servizio Sanitario Nazionale	Predisporre un programma specifico di linee-guida e PDTA	Centrale	indicatore dicotomico S/N
	Promuovere un adeguamento del quadro di norme e regole per l'utilizzo dei dati, la loro interoperabilità e il data sharing internazionale	Elaborare proposte di innovazione normativa	Centrale	indicatore dicotomico S/N
	Potenziare e rendere	Costituire un	Centrale	indicatore

	disponibile un Network di biobanche di popolazione	network con Hub in ISS (v Cap 6)		dicotomico S/N
	Potenziare la formazione universitaria in bioinformatica	Attivare corsi di laurea bioinformatica	Centrale	indicatore dicotomico S/N
	Implementare il Cognitive computing	Condurre studi di fattibilità	Centrale	indicatore dicotomico S/N
II. Tecnologie per la literacy	Utilizzo del web per funzioni di governo (accountability, open-government)	Realizzare un piano operativo per l'uso sul web dei dati sulla implementazione della genomica nel SSN	Centrale	indicatore dicotomico S/N
	Uso dei social media per la literacy mediante sistemi di 'watching&counseling	Predisposizione algoritmi, risorse tecniche, procedure	Centrale	indicatore dicotomico S/N
	Realizzare un sistema di app per i professionisti di prossimità	Emanare bando per start-up	Centrale	indicatore dicotomico S/N
III. Opportunità per la sostenibilità di sistema mediante il riposizionamento dei farmaci	Fornire supporto scientifico ,tecnologico e infrastrutturale al flusso di lavoro per il drug repositioning	Implementare un Centro di Eccellenza	Centrale	indicatore dicotomico S/N
III-1 Rendere più efficiente la ricerca in farmacogenomica	Costituire un network di centri di ricerca in farmacogenomica	Disponibilità di documenti di procedure per l'integrazione funzionale in rete	Centrale	indicatore dicotomico S/N
IV. Opportunità per la sostenibilità di sistema mediante la prevenzione pre-primaria finalizzata alla riduzione del	Acquisire elementi per una valutazione di fattibilità ed efficacia	Implementazione di un network di biobanche di popolazione (tale obiettivo è sinergico a quello del Topic I)	centrale	indicatore dicotomico S/N

burden di malattia		realizzazione di uno studio pilota in aree a grande impatto di inquinamento ambientale	Centrale	Attuazione dello studio ; indicatore dicotomico S/N
V. Opportunità per la sostenibilità di sistema mediante la prevenzione secondaria finalizzata alla riduzione del burden di malattia del cancro al seno	<ul style="list-style-type: none"> • Costruzione di uno score che consenta una stratificazione del rischio di CaM. • Valutare l'applicabilità dello score prodotto • Verificare la fattibilità di interventi farmacologici per la riduzione del rischio al di fuori del setting sperimentale 	realizzazione di uno studio pilota nested nei programmi di screening	Centrale	Attuazione dello studio ; indicatore dicotomico S/N
VI. Opportunità per la sostenibilità di sistema mediante la diagnosi precoce finalizzata alla riduzione del burden di malattia del cancro	<ul style="list-style-type: none"> • Utilizzo della Metabolomica nella diagnosi precoce del cancro • definire un paradigma 	realizzazione di uno studio pilota i	Centrale	Attuazione dello studio ; indicatore dicotomico S/N
VII. I malati senza diagnosi	costruire un percorso di livello nazionale per l'invio a centri selezionati dei pazienti eleggibili	Definire un PDTA nazionale	Centrale	indicatore dicotomico S/N
	Potenziare gli strumenti web-based	Implementare una Piattaforma web:	Centrale	indicatore dicotomico S/N

9.b Raccomandazioni trasversali

- Si ribadisce la importanza capitale di mantenere la prospettiva della sanità pubblica come garanzia di efficacia, efficienza ed equità nei processi di innovazione generati da questo Piano nel SSN
- Considerata la incisività e l'ampiezza della 'rivoluzione omica' è necessario un accurato monitoraggio del processo di implementazione del presente Piano anche al fine di verificarne tempestivamente l'impatto. È inoltre necessario un accurato monitoraggio delle performance dei servizi relativamente agli obiettivi del presente Piano mediante un adeguamento dei sistemi informativi e di quelli degli adempimenti previsti dai LEA.
- Poiché è costitutiva della presente pianificazione l'integrazione del SSN con altri ambiti di sviluppo del sistema paese, è fondamentale pervenire alla massima armonizzazione colle policy nei settori dello sviluppo digitale, della ricerca di base e della innovazione di sistema.
- Considerato che il presente atto di pianificazione ha la potenzialità di impattare, sia positivamente che negativamente, sulla sostenibilità del SSN, è necessaria un accurato monitoraggio relativamente ai costi derivanti dalla sua implementazione tramite l'utilizzo routinario di strumenti di verifica, dell'HTA (incluse, se necessario, modellizzazioni) al fine di poter intervenire tempestivamente laddove questo fosse opportuno.
- È fondamentale promuovere la dimensione della ricerca '-omica' non solo nella ricerca di base ma anche nella sanità pubblica nei relativi programmi e piano, sia in Italia che in EU.

GLOSSARIO

Allele	Ciascuna delle varie forme che può assumere un gene. In molti casi si può distinguere un allele normale e una serie di alleli mutati. In altri casi molti alleli hanno lo stesso diritto di fregiarsi del titolo di allele normale.
Animale transgenico.	Animale nel cui genoma è stato introdotto un gene estraneo (detto transgene) o è stato modificato artificialmente un determinato gene.
Antioncogene o gene oncosoppressore	Gene deputato al controllo stretto della proliferazione cellulare allo scopo di contrastare l'azione di eventuali oncogeni . Una sua inattivazione apre spesso la porta alla trasformazione della cellula stessa in direzione tumorale.
Apoptosi.	Fenomeno differenziativo cellulare controllato geneticamente per cui ad un certo punto dello sviluppo o della vita adulta una determinata cellula commette un suicidio. Sinonimo di morte cellulare programmata , si contrappone a necrosi che è un evento di morte passiva della cellula.
Autosoma	Ogni cromosoma che non sia né X né Y. Si contrappone a cromosoma sessuale .
Autosomica (eredità)	Forma di eredità esibita da tutti i geni che stanno su un autosoma . Si contrappone all'eredità legata al cromosoma X (o al sesso) .
Background genetico	Costituzione genetica complessiva di un individuo. Fa sentire il suo effetto sulla determinazione del fenotipo di ogni malattia ereditaria, monofattoriale o multifattoriale .
Big data	Set di dati la cui dimensione è al di là della capacità di acquisire, memorizzare, gestire e analizzare, propria degli strumenti tipici di software database Il Big Data comprende molteplici informazioni da archivi elettronici di assistenza sanitaria, social media, dati genomici e farmaceutici, risultati di test, telemedicina, app per cellulari, home monitoring, studi clinici, informazioni su benessere, comportamento, indicatori socioeconomici ecc.
Caratteri quantitativi	Caratteri fenotipici misurabili in termini di quantità continue, come l'altezza o il peso (caratteri quantitativi metrici), o di numeri naturali, come il numero delle dita o delle pliche cutanee dei polpastrelli delle dita (caratteri quantitativi meristici). Sono determinati in genere da più di un gene, mostrano cioè un' eredità multifattoriale .
Caratteri quantitativi a soglia	Caratteri ereditati secondo un' eredità multifattoriale come se si trattasse di caratteri quantitativi veri e propri ma che si manifestano in forme alternative, cioè come la presenza o l'assenza di una data caratteristica biologica.

Codice genetico	Schema della corrispondenza fra triplette del DNA e singoli aminoacidi .
Codificante (regione)	Porzione del gene nella quale è codificata la sequenza aminoacidica della corrispondente catena proteica .
Codone	Ciascuna delle 64 triplette di nucleotidi che codificano un residuo aminoacidico specifico secondo uno schema fisso e universale detto codice genetico . Sinonimo di tripletta .
Consulenza genetica	Servizio fornito alle famiglie dalla medicina moderna allo scopo di dare consigli per il trattamento o la prevenzione dei difetti ereditari. I suoi strumenti di lavoro sono l'analisi degli alberi genealogici familiari e la diagnostica biochimica, citogenetica e molecolare.
Cromosoma	Corpicciolo colorato che si trova all'interno del nucleo di ogni cellula. Può essere un autosoma o un cromosoma sessuale , cioè un X o un Y. Contiene un lungo filamento di DNA che porta centinaia o migliaia di geni. A seconda della posizione del centromero, si identificano cromosomi acrocentrici (con il centromero ad una estremità) o submetacentrici o metacentrici (via via che il centromero assume una posizione centrale)
Cromosoma sessuale	Il cromosoma X o il cromosoma Y, che sono i cromosomi che determinano il sesso, almeno negli esseri umani.
Delezione	Mancanza di un gene o di una sua porzione nel patrimonio genetico.
Difetto enzimatico o metabolico	Difetto genetico che coinvolge l'assenza o la ridotta funzionalità di un determinato enzima, che opera all'interno di una determinata via metabolica.
Diploide	Un organismo che possiede due copie di ogni cromosoma (autosomico). Tutte le specie più importanti, compresa la specie umana sono diploidi.
Dogma centrale della biologia molecolare	L'affermazione che l'informazione biologica fluisce dal DNA all'RNA e da questo alle proteine, simbolicamente DNA->RNA->proteine.
Dominante	(aggettivo associato a mutazione, mutante, difetto ereditario o genetico, malattia ereditaria o genetica, gene o allele). Una mutazione che produce un difetto fenotipico visibile anche in eterozigosi, quando è presente cioè in una sola copia su due.
Dna	Acido desossiribonucleico. Lunghissima molecola costituita dalla successione di quattro elementi costituenti detti basi o nucleotidi o meglio desossiribonucleotidi: adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T).
DNA polimerasi	L'enzima che catalizza la replicazione del DNA. Le DNA polimerasi di vari tipi di batteri vengono utilizzate nella biologia

	molecolare per diversi scopi, primo fra tutti l'amplificazione di frammenti genomici specifici per PCR .
DNA ricombinante	Una molecola di DNA staccata artificialmente dal suo contesto naturale e posta vicino ad altre sequenze di DNA, magari di specie diverse, viene chiamata DNA ricombinante. Metodologie del DNA ricombinante sono dette spesso le tecniche dell' ingegneria genetica .
Duplicazione	Ripetizione di un gene o di una sua porzione, che si viene a trovare quindi presente in più di una copia nel patrimonio genetico
Ereditabilità	Valore percentuale che indica l'incidenza dei fattori ereditari sulla determinazione di un certo tratto biologico, in contrapposizione a quella di fattori ambientali.
Esoma	La parte del genoma che codifica per proteine, esso rappresenta meno del 2% di tutta la sequenza del DNA presente nel genoma
Espressività	Gravità del fenotipo prodotto da una determinata mutazione .
Eterogeneità genetica	Il fenomeno per cui allo stesso fenotipo possono corrispondere alterazioni genetiche diverse, anche molto diverse. Per esempio la mancanza del pigmento in un fiore può essere dovuta a mutazioni diverse che colpiscono geni diversi che agiscono a vari livelli lungo la via metabolica che porta alla produzione di quel pigmento.
Eterozigote	(aggettivo e sostantivo) Individuo che porta nei suoi cromosomi due copie diverse dello stesso gene, solitamente una mutata e una normale.
Fenotipo	Aspetto esterno e stato di salute di un individuo. Nel caso di mutazioni dominanti il fenotipo di un individuo riflette direttamente il suo genotipo.
<i>Fingerprint</i> o <i>fingerprint</i> molecolare o <i>fingerprint</i> del DNA	Prende questo nome la visualizzazione della distribuzione di un certo numero di minisatelliti o microsatelliti presenti nel genoma di ogni singolo individuo. Ognuno di noi è caratterizzato da uno specifico <i>fingerprint</i> molecolare, diverso da quello di ogni altro. <i>Fingerprint</i> in inglese significa impronta digitale.
Gamete	Cellule germinale di uno dei due sessi che combinandosi con quella dell'altro sesso dà luogo ad un nuovo organismo. Il gamete femminile è la cellula-uovo mentre il gamete maschile è lo spermatozoo.
Gene	Tratto di DNA che codifica una specifica proteina. E' l'elemento del patrimonio genetico ereditato da una generazione all'altra.
Gene oncosoppressore o antioncogene	Gene deputato al controllo stretto della proliferazione cellulare allo scopo di contrastare l'azione di eventuali oncogeni . Una sua inattivazione apre spesso la porta alla trasformazione della

	cellula stessa in direzione tumorale.
Gene regolatore	Gene che codifica una proteina con funzioni di fattore regolatore.
Gene strutturale	Gene che codifica una proteina che non ha a sua volta funzioni di controllo.
Genoma	Sinonimo di patrimonio genetico, designa l'insieme di tutti i geni di un individuo.
Genomica	Disciplina che studia diversi geni contemporaneamente e/o la struttura e la funzione di larghi tratti del genoma .
Genoma Umano (progetto)	Iniziativa internazionale volta alla determinazione della sequenza nucleotidica dell'intero genoma umano, costituito di più di tre miliardi di nucleotidi.
Genotipo	Assetto genetico di un determinato individuo per quanto riguarda un determinato gene. Se si ha a che fare con una mutazione dominante il genotipo corrisponde all'aspetto esterno dell'individuo stesso, cioè al suo fenotipo . Se si ha a che fare con una mutazione recessiva i due termini non si corrispondono.
Governance	Il modo in cui il potere è esercitato mediante le istituzioni economiche, politiche e sociali di una nazione (World Bank's PRSP Handbook). (<i>anche</i>) Insieme di attori che all'interno di un sistema interagiscono e contribuiscono al raggiungimento degli obiettivi (Stoker G 1998)
Health technology assessment	approccio multidimensionale e multidisciplinare per l'analisi delle implicazioni medico-cliniche, sociali, organizzative, economiche, etiche e legali di una tecnologia attraverso la valutazione di più dimensioni quali l'efficacia, la sicurezza, i costi, l'impatto sociale e organizzativo. L'obiettivo è quello di valutare gli effetti reali e/o potenziali della tecnologia, sia a priori che durante l'intero ciclo di vita, nonché le conseguenze che l'introduzione o l'esclusione di un intervento ha per il sistema sanitario, l'economia e la società.
Ibridazione o ibridazione molecolare	Associazione molecolare di due sequenze di DNA identiche o di una sequenza di DNA ed un'identica sequenza di RNA. Perché possa avvenire, almeno una delle due sequenze deve essere in soluzione.
Ibridazione in sito	Tecnica di biologia molecolare che permette di visualizzare la localizzazione di una sequenza nucleotidica. L' ibridazione in sito su tessuti permette di visualizzare la localizzazione all'interno del corpo dell'RNA messaggero di un determinato gene. L' ibridazione in sito sui cromosomi permette di visualizzare la localizzazione di un determinato gene sui cromosomi di una cellula.
Inserzione	Presenza di un nucleotide soprannumerario all'interno della sequenza normale di un gene o di una regione genomica

	estranea all'interno di un gene.
Inversione	Alterazione dell'assetto di un cromosoma per la quale una regione più o meno estesa si trova orientata nella direzione opposta rispetto a quella naturale.
Linea guida	«raccomandazioni di comportamento clinico, elaborate mediante un processo di revisione sistematica della letteratura e delle opinioni di esperti, con lo scopo di aiutare i medici e i pazienti a decidere le modalità assistenziali più appropriate in specifiche situazioni cliniche
Knock-out o esperimento di knock-out.	Distruzione dell'integrità di un gene di un animale transgenico , prodotta in laboratorio allo scopo di studiarne gli effetti.
Malattie complesse o multifattoriali	Malattie dovute al sommarsi di varianti nei nostri geni e dall'esposizione a fattori ambientali. Non sono ereditarie, anche se tendono a ricorrere più frequentemente all'interno delle famiglie con già casi di malattia. In questi casi si parla di suscettibilità, ad indicare il peso dei fattori genetici che causano la malattia.
Malattie monogeniche o mendeliane	Malattie dovute difetti di singoli geni, si trasmettono secondo modalità ereditarie, con la trasmissione del difetto genetico dai genitori ai figli. Sono più di 8000 le malattie monogeniche presenti nel catalogo conosciuto, per più della metà è noto quale sia il gene che quando è difettoso causa la malattia.
Malattie cromosomiche	Malattie dovute ad errori di struttura o di numero dei cromosomi. La malattia è dovuta ad un errato dosaggio dei geni, normalmente duplice (diploide), che riguardano un intero cromosoma, o parte di esso. Di solito non sono ereditarie, in quanto l'errore si genera alla formazione dei gameti.
Malattie multifattoriali	Vedi malattie complesse
Mappa cromosomica	Diagramma indicante i vari cromosomi di una determinata specie con l'indicazione della localizzazione dei vari geni presenti su di essi. Talvolta usato come sinonimo di mappa genetica .
Mappa fisica	Localizzazione di geni e più generalmente di marcatori genetici all'interno di frammenti genomici più o meno estesi che possono anche corrispondere ad un intero cromosoma. La distanza tra i vari marcatori è proporzionale alla distanza fisica espressa in numero di nucleotidi intercorrenti.
Mappa genetica	In senso lato, localizzazione dei geni sui vari cromosomi di una data specie. In senso stretto, determinazione della posizione relativa di vari geni situati su un determinato cromosoma, ottenuta per via genetica classica, cioè osservando la frequenza degli eventi di ricombinazione intercorrenti fra i geni presi a due

	a due.
Marcatori genomici	Sequenze di DNA che possono agire come marcatori e che hanno una distribuzione diversa negli individui di una data popolazione. Sono costituiti da una sequenza STS di SNP o di IN/DEL.
Medicina personalizzata	ci si riferisce ad un modello medico che utilizza la caratterizzazione dei fenotipi e genotipi degli individui (ad esempio profilo molecolare, imaging medicale, i dati di stile di vita) per adattare la strategia terapeutica giusta per la persona giusta al momento giusto, e / o per determinare la predisposizione alla malattia e / o per fornire interventi di prevenzione tempestivi e mirati
Medicina di precisione	è un approccio emergente per il trattamento della malattia e la prevenzione che tenga conto della variabilità individuale nei geni, ambiente e stile di vita per ogni persona. Questo approccio consentirà di medici e ricercatori di prevedere con maggiore precisione quale sia il trattamento e le strategie di prevenzione per una particolare malattia lavoreranno in cui gruppi di persone.
Medicina predittiva	consiste in quell'approccio che – prima e/o dopo la nascita - tende a scoprire e valutare in termini probabilistici i fattori che, per una specifica persona e in un dato contesto, possono favorire l'insorgenza di una malattia
Mendeliana (eredità)	Eredità di un carattere specificato da un singolo gene. Sinonimo di eredità monofattoriale o Monogenica .
Messaggero	Sinonimo di RNA messaggero o mRNA .
Microsatelliti e minisatelliti	Semplici sequenze nucleotidiche ripetute un certo numero di volte nel genoma e distribuite in maniera casuale e spesso variabile da persona a persona. I prefissi 'micro' e 'mini' si riferiscono in modo abbastanza approssimativo alla loro effettiva lunghezza.
Modello animale	Ceppo di topi, o altri mammiferi, che mostrano sintomi molto simili a quelli di una certa malattia umana.
Monofattoriale (carattere)	Carattere biologico specificato da un solo gene. Viene ereditato secondo un modello di eredità monofattoriale o mendeliana.
Multifattoriale (carattere)	Carattere biologico determinato dall'azione concertata di più di un gene. Viene ereditato secondo un modello di eredità multifattoriale o quantitativa.
Mutàgeno o agente mutàgeno	Sostanza o agente fisico capace di aumentare la probabilità di una mutazione in una cellula o in un organismo.

Mutazione	Alterazione della sequenza nucleotidica di un gene. Se è presente nelle cellule della linea germinale, può venire ereditata dalla prole.
Mutazione di senso	Mutazione puntiforme che comporta la sostituzione di un aminoacido con un altro.
Mutazione nonsense o di terminazione	Mutazione puntiforme che causa l'interruzione prematura della corrispondente catena proteica .
Mutazione puntiforme	Una mutazione che coinvolge un solo nucleotide .
Mutazione sinonima o stesso senso	Mutazione puntiforme che non comporta la sostituzione di un aminoacido perché la nuova tripletta codifica lo stesso aminoacido della vecchia.
Mutazione somatica	Mutazione che ha luogo in una cellula somatica. Per definizione non viene trasmessa alla prole ma resta confinata al clone cellulare derivante dalla cellula dove si è verificata.
Nucleotide	Componente elementare del DNA o dell'RNA. Nel primo caso può essere A, G, C o T; nel secondo caso A, G, C, o U.
Omozigote	(aggettivo e sostantivo). Portante due copie identiche dello stesso gene. Queste due copie possono essere tutte e due normali o tutte e due mutanti per la stessa mutazione.
Oncogene	Gene capace di spingere una cellula lungo la via dello sviluppo di un tumore. Si origina per mutazione da un protooncogene .
Penetranza	Percentuale di individui portatori di un certo genotipo che mostrano un fenotipo o uno specifico tratto fenotipico.
Penetranza incompleta	Penetranza inferiore al 100%. Malattie genetiche a penetranza incompleta sono quelle che mostrano una penetranza inferiore al 100%.
PCR (reazione di amplificazione tramite) (polymerase chain reaction).	Serie di reazioni a catena che permettono di amplificare enormemente uno specifico frammento di DNA. L'enzima utilizzato è una DNA polimerasi , l'enzima che serve alla cellula batterica per duplicare il proprio DNA. Il frammento da amplificare deve essere limitato da due corte sequenze nucleotidiche note.
PDTA percorso diagnostico- terapeutico- assistenziale	si intende una sequenza predefinita, articolata e coordinata di prestazioni, ambulatoriali e/o di ricovero, che prevede la partecipazione integrata di diversi specialisti e professionisti, al fine di realizzare la diagnosi e la terapia più adeguate per una specifica patologia. .
Pleiotropia	Il fenomeno per cui ad una singola mutazione corrispondono molti effetti fenotipici diversi. La maggior parte dei geni di un organismo evoluto come l'uomo dà luogo ad effetti pleiotropici quando muta.
Polimorfismo	Presenza di alleli diversi di uno stesso gene, ciascuno dei quali

	<p>comparire con una frequenza non trascurabile nella popolazione. Un esempio tipico di polimorfismo è dato dal gene del gruppo sanguigno AB0 o da quello del gruppo sanguigno Rh. Oggi si tende a parlare di polimorfismo per qualsiasi differenza di sequenza nel DNA dei vari individui, indipendentemente dalla frequenza con cui questa compare e dalla lunghezza del tratto di DNA interessato, che può anche ridursi ad un singolo nucleotide. Si parla in quest'ultimo caso di polimorfismo di singolo nucleotide (SNP).</p>
Polimorfismo di singolo nucleotide (SNP)	<p>La presenza nella popolazione di individui che possiedono nucleotidi diversi nella stessa posizione genomica, che può tanto all'interno di una regione genica, quanto in una regione intergenica.</p>
Portatrici o portatrici sane	<p>Femmine eterozigoti per una mutazione a carico di un gene legato al cromosoma X. Metà dei loro figli maschi saranno affetti da quel determinato difetto genetico.</p>
Postgenomica (era)	<p>Si indicano talvolta con questo termine gli anni susseguenti al completamento della decifrazione del genoma umano. Spesso sinonimo di genomica, che però è termine migliore.</p>
Predisposizione	<p>Condizione genetica che predispone allo sviluppo di una determinata malattia.</p>
Progressione tumorale	<p>Serie di stadi successivi, progressivamente più gravi, nello sviluppo di un tumore. Oggi si sa che questo fenomeno deriva spesso dall'accumularsi di sempre nuove mutazioni nocive da parte delle cellule precancerose e cancerose.</p>
Promotore	<p>Regione di DNA che si trova immediatamente a monte dell'inizio di trascrizione di un gene.</p>
Proteoma	<p>Termine di recente introduzione che designa l'insieme delle proteine presenti in un dato organismo. E' l'oggetto di studio della proteomica.</p>
Proteomica	<p>Parte della biologia che studia le proteine e/o il proteoma.</p>
Protooncogene	<p>Gene cellulare potenzialmente capace di trasformarsi in un oncogene, a seguito di una mutazione che può capitare nella sua regione codificante o nelle sue regioni regolative.</p>
Recessivo	<p>(aggettivo associato a mutazione, mutante, difetto ereditario o genetico, malattia ereditaria o genetica, gene o allele). Una mutazione che non produce un difetto fenotipico visibile in eterozigosi, quando è presente cioè in una sola copia su due, ma soltanto in omozigosi, quando cioè le due copie del gene sono entrambe mutate.</p>
Regione codificante	<p>Porzione del gene che contiene l'informazione per costruire il corrispondente prodotto proteico.</p>

Regioni non tradotte	Porzioni del gene che si trovano a monte (regione non tradotta a monte o al 5' o regione 5' non tradotta) e a valle (regione non tradotta a valle o al 3' o regione 3' non tradotta) della regione codificante . Quella che si trova al 3' può essere anche molto lunga.
Regolazione genica	Controllo dell'espressione di un gene o di un gruppo di geni.
Restrizione (enzima di)	Enzima di origine batterica capace di tagliare il DNA in punti
Ricombinazione o ricombinazione genetica	Scambio reciproco di materiale genetico fra regioni corrispondenti nelle due copie dello stesso cromosoma . Può essere omologa e non omologa.
Ricombinazione omologa	Fenomeno biologico naturale per cui regioni simili o identiche sulle due copie dello stesso cromosoma tendono ad appaiarsi e a ricombinare.
Rna	Acido ribonucleico. Lunga molecola costituita di quattro elementi costituenti detti basi o nucleotidi o meglio ribonucleotidi: adenina (A), guanina (G), citosina (C) e uracile (U).
Satelliti o DNA satellite	Semplici sequenze nucleotidiche ripetute un certo numero di volte nel genoma e distribuite in maniera casuale e spesso variabile da persona a persona.
Sequenze ripetute	Sequenze nucleotidiche ripetute un certo numero di volte nel genoma di una determinata specie. L'insieme delle sequenze ripetute può rappresentare facilmente anche il 30% del DNA dell'intero patrimonio genetico.
Sequenziamento	Metodo per identificare la successione dei nucleotidi in un tratto di DNA
Sequenziamento Sanger	Metodo tradizionale di sequenziamento di tratti di DNA di lunghezza variabile, mediante una reazione di copiatura del DNA che si blocca grazie all'introduzione di basi nucleotidiche che arrestano la reazione. La successione dei nucleotidi nel tratto analizzato è resa possibile da una corsa elettroforetica in un capillare
Sequenziamento di nuova generazione o NGS	Metodi di sequenziamento di tratti di DNA molto estesi, fino a coprire l'intero genoma o la sua parte codificante (esoma), o l'insieme di numerosi geni (sequenziamento Targeting resequencing). Grazie a procedure diverse, è possibile ottenere la sequenza di parti diverse del genoma (fino all'intero genoma), che vengono riallineate attraverso procedure bioinformatiche fino ad ottenere l'intera sequenza esaminata, che viene confrontata con quella di riferimento
Sindrome	Complesso di sintomi e segni patologici. Alcuni di questi sono costanti nei diversi individui affetti mentre altri possono essere presenti in alcuni individui e assenti in altri.

SNP (<i>single nucleotide polymorphism</i>)	Sinonimo di polimorfismo di singolo nucleotide .
Sonda (radioattiva o marcata)	Frammento di DNA (o di RNA) reso radioattivo (o marcato con un colorante) usato in un esperimento di ibridazione molecolare per individuare un altro frammento contenente una sequenza molto simile.
Stewardship	Gestione attenta e responsabile del benessere di una popolazione. (<i>anche</i>) Gestione etica delle risorse
STS (sequenze)(<i>sequence-tagged sites</i>)	Coppie di brevissime sequenze nucleotidiche situate agli estremi di corti frammenti di DNA di localizzazione cromosomica nota. Utilizzando una coppia di STS si può immediatamente sintetizzare, per PCR , l'intero frammento genomico intercorrente.
Terapia genica	Tecnologia mirante all'eliminazione di un difetto genico mediante intervento diretto sul DNA della cellula in questione.
Terapia genica germinale	Terapia genica realizzata sulle cellule della linea germinale. Il suo effetto può venir trasmesso alla prole dell'individuo trattato.
Terapia genica somatica	Terapia genica realizzata sulle cellule somatiche. Il suo effetto non viene trasmesso alla prole dell'individuo trattato.
Transgene	Gene estraneo introdotto nel genoma di un animale transgenico .
Transgenico	(animale, topo). Animale nel cui genoma è stato introdotto un gene estraneo (detto transgene) o è stato modificato artificialmente un determinato gene.
Trascrittoma	Termine di recente introduzione che designa l'insieme dei prodotti trascrizionali (RNA vari) presenti in un dato organismo. Il suo studio è complementare a quello del genoma .
Trascrizione	Sintesi di un filamento di RNA su uno stampo di DNA.
Traslocazione	Trasposizione di un pezzo di cromosoma, all'interno dello stesso cromosoma o più spesso su di un cromosoma diverso da quello di partenza.
Tripletta	Terzetto di nucleotidi sinonimo di codone . Ogni tripletta codifica un particolare aminoacido ad eccezione delle tre triplette di terminazione , che determinano solamente la fine della catena proteica nascente.
Tripletta di terminazione o di Stop o nonsense	Una delle tre triplette TAA, TAG o TGA. In corrispondenza di queste la sintesi proteica si arresta e la proteina neosintetizzata viene rilasciata.
Zigote	Sinonimo di cellula-uovo fecondata. Lo zigote contiene il patrimonio genetico dell'individuo e dallo zigote parte lo sviluppo embrionale di quello stesso individuo

Hanno partecipato alla redazione del Piano i seguenti Autori:

Prof.ssa Roberta Siliquini, Prof. Antonio Amoroso, Prof.ssa Stefania Boccia, Prof Bruno Dallapiccola, Dr. Andrea De Censi, Dr. Antonio Federici, Dr. Raniero Guerra, Prof. Maurizio Memo, Prof. Giuseppe Novelli, Prof. Walter Ricciardi

Hanno contribuito:: Prof Maurizio Genuardi, Prof. Vincenzo Atella