

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO IN SCIENZE MEDICHE GENERALI E DEI SERVIZI
XXXV CICLO

Settore Concorsuale: 06/H1 -Ginecologia e Ostetricia
Settore Scientifico Disciplinare: MED/40 – Ginecologia e Ostetricia

I tumori ovarici correlati all'endometriosi

Presentata da: Dott.ssa Giulia Dondi

Coordinatore Dottorato:
Chiar.ma Prof.ssa Susi Pelotti

Supervisore:
Chiar.ma Prof.ssa Giuliana Simonazzi

Co-supervisore:
Chiar.mo Prof. Pierandrea De Iaco

Esame finale anno 2024

INDICE

1. ABSTRACT	4
2. INTRODUZIONE	6
2.1 L'endometriosi.....	6
2.2 Il carcinoma ovarico.....	9
2.3 Endometriosi e rischio di cancro	10
2.4 Il carcinoma ovarico correlato all'endometriosi	11
2.5 Carcinomi correlati all'endometriosi extra ovarica	15
2.6 Carcinomi correlati all'endometriosi e sindrome di Lynch	16
2.7 MiRNA nell'endometriosi e nei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi.....	17
2.8 Descrizione ecografica delle masse annessiali e rischio di malignità	19
2.9 Le caratteristiche ecografiche dei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi	20
3. OBIETTIVI DELLO STUDIO	24
4. MATERIALI E METODI	25
4.1 Disegno dello studio	25
4.2 Popolazione dello studio.....	25
4.3 Analisi istopatologica.....	26
4.4 Estrazione di DNA e RNA.....	26
4.5 Analisi di Next Generation Sequencing	27
4.6 Analisi dell'espressione differenziale dei miRNA.....	28
4.7 MiRNA pathway analysis	29
4.8 Analisi dei target dei miRNA	30
4.9 Analisi statistica.....	30
5. RISULTATI	32
5.1 Caratteristiche cliniche della popolazione	32
5.2 Caratteristiche ecografiche delle tumefazioni annessiali	33
5.3 Marcatori tumorali	39
5.4 Trattamento, caratteristiche istopatologiche e prognosi	41
5.5 Analisi immunoistochimica e molecolare	44
5.6 Analisi dell'espressione dei miRNA	47
6. DISCUSSIONE	54
6.1 Il carcinoma ovarico correlato all'endometriosi: un problema di definizione.....	54
6.2 L'età alla diagnosi nelle pazienti affette da EROC correlato	54
6.3 Progressa diagnosi di endometriosi e storia di infertilità	55

6.4	Familiarità neoplastica: il ruolo della genetica	55
6.5	L'ecografia ginecologica: il ruolo centrale dell'operatore esperto.....	56
6.6	EROC correlato e neoplasie endometriali	57
6.7	Istotipi correlati all'endometriosi e ipotesi di trasformazione neoplastica.....	57
6.8	Marcatori tumorali: il ruolo chiave del CA 19.9 nella diagnosi e nel follow-up degli EROC	58
6.9	Espressione dei miRNA e pathway up e downregolate negli EROC	59
6.10	Punti di forza, limiti dello studio e prospettive future	61
7.	CONCLUSIONI	63
8.	BIBLIOGRAFIA	65

1. ABSTRACT

Introduzione: L'endometriosi è una patologia infiammatoria cronica recidivante definita dalla presenza di tessuto endometriale al di fuori della cavità uterina che colpisce circa il 10-15% della popolazione femminile. I dati della letteratura suggeriscono che l'endometriosi si associ a un rischio leggermente aumentato, di sviluppare un carcinoma ovarico, soprattutto per quanto riguarda gli istotipi a cellule chiare ed endometrioide. I fattori di rischio noti correlati alla trasformazione neoplastica dell'endometriosi sono lo stato menopausale, un diametro della cisti endometriosica superiore a 9 cm e la presenza di componenti solide che aggettano al suo interno rilevate ecograficamente. Allo stato attuale non esistono linee guida specifiche sulla sorveglianza o sulla chirurgia per le pazienti in menopausa o perimenopausa affette da endometriosi e l'endometriosi cancerizzata risulta un argomento di cui esistono ancora poche evidenze in letteratura.

Obiettivi dello studio: Gli obiettivi principali sono determinare la percentuale di tumori ovarici correlati o associati all'endometriosi rispetto alla percentuale totale di carcinomi ovarici trattati nel nostro centro e confrontare le loro caratteristiche cliniche, ecografiche, istopatologiche e molecolari. Gli obiettivi secondari sono valutare l'espressione dei marcatori tumorali nei tre gruppi di studio, identificare la presenza di profili mutazionali specifici mediante un pannello NGS nei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi e identificare la presenza di miRNA disregolati nei tumori ovarici correlati all'endometriosi rispetto al tessuto non tumorale (endometriosi).

Materiali e metodi: Questo è uno studio osservazionale, prospettico di coorte, monocentrico, non sponsorizzato, non farmacologico, con impiego di tessuti umani in vitro. Dal 01/11/2021 al 30/06/2023, sono state arruolate 94 pazienti affette da carcinoma ovarico che rispondevano ai seguenti criteri di inclusione: diagnosi istologica di carcinoma ovarico; esecuzione di ecografia transvaginale e transaddominale presso gli ambulatori dell'U.O.C. di Ginecologia Oncologica; età compresa tra 18 e 90 anni e ottenimento del consenso informato. Tutte le pazienti arruolate sono state sottoposte ad un intervento chirurgico con asportazione di tessuto tumorale come previsto dal normale iter assistenziale. Sul tessuto tumorale asportato sono state condotte analisi istologiche, immunoistochimiche e molecolari studio specifiche ed è stata effettuata l'estrazione dei miRNA.

Risultati: 48/94 pazienti (51%) sono risultate affette da carcinoma ovarico non correlato e non associato all'endometriosi (non EROC), 17/94 (18%) da carcinoma ovarico associato all'endometriosi (EROC associato) e 29/94 (31%) da carcinoma ovarico correlato all'endometriosi (EROC correlato). L'età media alla diagnosi è risultata inferiore nelle pazienti con carcinoma ovarico correlato all'endometriosi e con carcinoma ovarico associato all'endometriosi rispetto a quelle con carcinoma ovarico non EROC (57 anni e 61 anni vs 65 anni). Abbiamo riscontrato due caratteristiche ecografiche che differenziano i carcinomi associati e i carcinomi correlati all'endometriosi dai carcinomi non

EROC: l'unilateralità della lesione (nel 66,7% e 69% vs 41,3% dei casi) e la minor presenza di versamento pelvico (11,8% e 31% vs 47,9% dei casi). Lo spessore endometriale è risultato maggiore nelle pazienti affette da EROC correlato (media 8,35 mm) rispetto agli altri due gruppi (media <5 mm in entrambi). L'applicazione del modello ADNEX ha dimostrato una maggiore sensibilità nei carcinomi ovarici non EROC rispetto ai carcinomi associati e correlati all'endometriosi (89% vs 60% e 79%). Il CA 19.9 ha mostrato valori notevolmente più elevati nei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi (media 756 U/ml) rispetto agli altri due gruppi (media <30 U/ml). All'esame istologico definitivo gli istotipi a cellule chiare ed endometrioide risultavano correlati all'endometriosi nella totalità dei casi. L'istotipo simil-mesonefrico è risultato correlato all'endometriosi in 5/6 pazienti (83% dei casi). Lo stadio della malattia alla diagnosi è risultato meno avanzato nelle pazienti affette da carcinoma ovarico correlato all'endometriosi, con il 75,8% delle pazienti che riceve la diagnosi in stadio I e II. Al contrario, tra le pazienti affette da carcinoma non EROC solo il 25% ha una diagnosi in stadio iniziale (I-II) e tra gli EROC associati questa percentuale raggiunge il 29,4%. Una maggior percentuale di pazienti affette da EROC correlato aveva inoltre una patologia endometriale neoplastica o preneoplastica rispetto alle pazienti affette da EROC associato e non EROC (48% vs 17,6% e 10,5% rispettivamente). Le mutazioni nei geni BRCA1 e BRCA2 sono risultate più rappresentate negli EROC associati rispetto ai non EROC e agli EROC correlati (53% vs 18% e 10%). Applicando la nuova classificazione molecolare introdotta dal TCGA ai carcinomi ovarici correlati all'endometriosi abbiamo identificato 15 casi classificati come NSMP, 3 casi appartenenti al gruppo p53 abn, 3 casi MMRd e 3 POLEmut. Cinque casi non sono stati classificati perché l'analisi NGS risultava ancora in corso al momento dell'analisi dei dati. È stata eseguita un'analisi dei miRNA sul tessuto tumorale di 14 pazienti affette da EROC correlato. In 9 di queste è stata effettuata un'analisi sull'endometriosi coesistente. L'espressione di 276 miRNA è risultata differente nel tessuto tumorale rispetto al tessuto non tumorale (endometriosi), 129 miRNA sono risultati upregolati nel gruppo EROC e 147 downregolati.

Conclusioni: Da questo studio sono emerse numerose differenze tra i carcinomi ovarici correlati, associati e non correlati e non associati all'endometriosi in termini clinici, ecografici e istopatologici. Il gruppo dei tumori associati all'endometriosi mostra talvolta analogie con i tumori correlati all'endometriosi e talvolta analogie con i tumori non EROC. Dai nostri dati preliminari emerge un'espressione differenziale dei miRNA nei carcinomi EROC correlati rispetto al tessuto non tumorale (endometriosi).

2. INTRODUZIONE

2.1 L'endometriosi

L'endometriosi è una malattia infiammatoria cronica recidivante definita dalla presenza di tessuto endometriale al di fuori della cavità uterina [1]. La prevalenza esatta dell'endometriosi è sconosciuta, si stima che colpisca dal 2% al 10% della popolazione femminile generale e fino al 50% delle donne infertili. Nel complesso l'endometriosi colpisce circa 190 milioni donne in tutto il mondo [2]. Questa patologia viene più frequentemente diagnosticata nelle donne tra i 25 e i 35 anni, ma può manifestarsi anche durante l'adolescenza o in età riproduttiva avanzata. I sintomi associati all'endometriosi includono dismenorrea, dolore pelvico cronico, dolore peri ovulatorio, dischezia, dispareunia e disuria. Le localizzazioni più comuni dell'endometriosi includono: l'ovaio (65% dei casi), i legamenti utero-sacrali (46% dei casi), il peritoneo pelvico a livello della fossetta ovarica e dello scavo del Douglas (30% dei casi) [3]. Talvolta questa condizione può interessare l'intestino, gli ureteri e la parete addominale configurando un quadro di endometriosi profonda, denominata "deep infiltrating endometriosis" (DIE), in questo caso i distretti più frequentemente interessati sono il setto rettovaginale, il sigma-retto, la vescica e gli ureteri. [4].

Esistono tre sottotipi di endometriosi: peritoneale, ovarica o profonda [5]. La malattia peritoneale superficiale presenta impianti superficiali a livello del peritoneo pelvico con un aspetto macroscopico variabile. L'endometriosi ovarica può localizzarsi sulla superficie dell'ovaio o causare cisti a contenuto denso color cioccolato. L'endometriosi profonda infiltra strutture come il sigma retto, la vescica e gli ureteri, ed è associata a sintomi di dischezia/ematochezia, disuria/ematuria e ostruzione ureterale/idronefrosi.

L'eziopatogenesi dell'endometriosi resta in gran parte sconosciuta. L'origine più accreditata è quella della mestruazione retrograda, ovvero il reflusso di cellule endometriali vitali attraverso le tube di Falloppio all'interno cavità peritoneale durante il ciclo mestruale. Tuttavia, questa teoria non spiega il fatto che, sebbene la mestruazione retrograda sia presente in circa il 90% delle donne, solo il 10% di esse sviluppa l'endometriosi [2]. La metaplasia celomica è un'altra delle ipotesi avanzate sull'origine dell'endometriosi e consiste nella trasformazione del mesotelio peritoneale in tessuto endometriale [6]. Le evidenze suggeriscono quindi una genesi multifattoriale dell'endometriosi con il coinvolgimento di fattori ambientali, immunologici, genetici ed ormonali [7].

I fattori ambientali, in particolare le sostanze che interferiscono con il sistema endocrino, sembrano svolgere un ruolo rilevante. Una metanalisi di 30 studi epidemiologici ha mostrato un aumento del rischio di sviluppare endometriosi associato all'esposizione a tre interferenti endocrini: bifenili policlorurati, pesticidi clorurati e ftalati [8].

L'endometriosi provoca una risposta immunitaria e infiammatoria locale con la produzione di citochine, chemochine e prostaglandine anche se non è chiaro se la disfunzione immunitaria contribuisca a causare l'endometriosi o sia secondaria all'insorgenza della patologia [2].

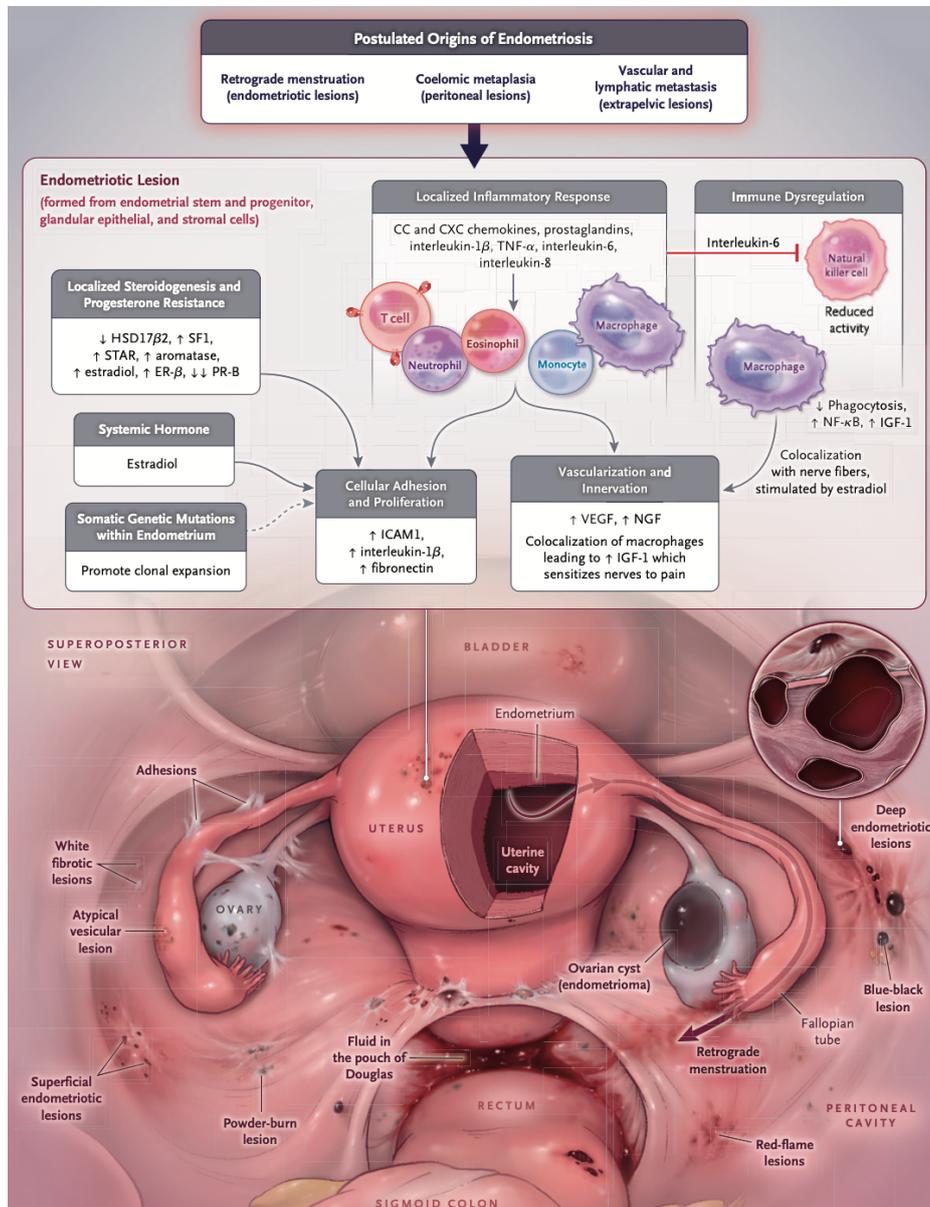


Figura 1. Patogenesi e caratteristiche fisiopatologiche dell'endometriosi. Le possibili origini dell'endometriosi comprendono la mestruazione retrograda e la metaplasia celomica in situ della membrana peritoneale. Le lesioni endometriosiche vengono poi mantenute attraverso meccanismi molecolari interagenti che promuovono l'adesione e la proliferazione cellulare, la steroidogenesi, la risposta infiammatoria localizzata e la disregolazione del sistema immunitario. Da Zondervan et al., *N Engl J Med* 2020 [2]

In un recente articolo, è stata avanzata l'ipotesi di un ruolo patogenetico del *Fusobacterium* nella genesi dell'endometriosi. Dai dati provenienti da questo studio il 64% delle pazienti affette da endometriosi presentava un'infezione da *Fusobacterium* nell'endometrio e nelle lesioni endometriosiche, mentre tale infezione era riscontrata in meno del 10% dei soggetti di controllo.

Inoltre, attraverso l'inoculazione del *Fusobacterium* in un modello murino, si è osservato un aumento sia nel numero che nelle dimensioni delle lesioni endometrioidiche. È interessante notare che la terapia antibiotica mirata a eradicare questo agente patogeno ha portato ad una significativa riduzione sia del numero che delle dimensioni delle lesioni endometrioidiche presenti nel modello murino. Questi risultati suggeriscono un possibile legame tra l'infezione da *Fusobacterium* e lo sviluppo o l'aggravamento dell'endometriosi, aprendo nuove prospettive di ricerca nel campo della prevenzione e del trattamento di questa condizione medica [9].

Da un punto di vista molecolare, l'endometriosi è caratterizzata da una perdita della funzione di ARID1A, PTEN, PIK3CA, CTNNB1 e dall'attivazione di KRAS [10].

La diagnosi dell'endometriosi si basa sulla valutazione clinica e sull'impiego di esami strumentali. In particolare l'ecografia transvaginale mostra una sensibilità e specificità superiori al 90% se eseguita da un operatore esperto e risulta essere la tecnica di imaging di primo livello nella diagnosi dell'endometriosi [11,12]. Una metanalisi condotta da Hudelist et al. ha dimostrato che questa metodica di imaging è in grado di identificare con precisione l'endometriosi profonda localizzata nel retto sigma [13]. La metodologia dell'esame ecografico per la diagnosi di endometriosi è stata descritta dal gruppo IDEA (International Deep Endometriosis Analysis) che ha pubblicato una consensus opinion con l'obiettivo di standardizzare la misurazione delle lesioni endometrioidiche e uniformare la terminologia utilizzata per descrivere la localizzazione e le caratteristiche ecografiche dell'endometriosi profonda, degli endometriomi e dell'adenomiosi [14]. Secondo l'IDEA Consensus Statement l'esame ecografico dovrebbe articolarsi in quattro fasi. La prima fase prevede la valutazione dell'utero e degli annessi per identificare segni ecografici di adenomiosi e/o presenza di cisti endometrioidiche. Le dimensioni delle cisti endometrioidiche dovrebbero essere misurate nei tre piani ortogonali, le caratteristiche ecografiche delle cisti dovrebbero essere descritte utilizzando la terminologia dell'International Ovarian Tumor Analysis (IOTA) [15]. Un endometrioma atipico è definito come una cisti uniloculare solida a contenuto "ground glass" con almeno una papilla [16].

Il secondo step consiste nella ricerca dei "soft markers" ovvero segni ecografici indiretti indicativi di endometriosi, ad esempio l'assenza di mobilità delle ovaie e il dolore evocato dalla pressione mirata della sonda vaginale. Il terzo step consiste nella valutazione del cavo del Douglas utilizzando il cosiddetto "sliding sign". Lo "sliding sign" è positivo quando esercitando una leggera pressione contro il collo dell'utero con la sonda transvaginale, il retto anteriore scivola liberamente lungo la superficie posteriore dell'utero e la parete vaginale posteriore. Il quarto step prevede la ricerca di noduli di endometriosi profonda a carico del comparto anteriore e posteriore.

Il trattamento dell'endometriosi riguarda principalmente due aspetti: il dolore e l'infertilità associate a tale patologia. La terapia medica basata sull'utilizzo di terapie ormonali (contraccettivi orali

combinati o progestinici) o l'approccio chirurgico devono essere valutati tenendo conto di numerosi fattori quali età, resistenza alla terapia medica, controindicazioni e preferenze della paziente [17]. Nel caso di pazienti con diagnosi di endometriosi dopo la menopausa, è importante considerare il possibile sebbene basso rischio di trasformazione neoplastica. Di conseguenza, la letteratura scientifica concorda sull'opportunità che il trattamento di prima scelta per l'endometriosi nelle pazienti in menopausa dovrebbe essere chirurgico [18].

2.2 Il carcinoma ovarico

I carcinomi ovarici costituiscono circa il 30% dei tumori maligni dell'apparato genitale femminile e si collocano al decimo posto per incidenza nella popolazione femminile. Il tumore ovarico rappresenta inoltre la principale causa di mortalità tra i tumori ginecologici nei paesi sviluppati. Nel 2020, secondo i dati riportati da GLOBOCAN, sono stati registrati 313.959 nuovi casi di carcinoma ovarico e 207.252 decessi correlati a questa neoplasia [19]. L'Associazione Italiana di Oncologia (AIOM) e l'Associazione Italiana dei Registri Tumori (AIRTUM) hanno calcolato che in Italia sono stati registrati 5.200 nuovi casi di tumore ovarico nel 2020. Ciò significa che, in media, una donna italiana su 82 sviluppa il tumore ovarico nell'arco della propria vita. Nella regione Emilia-Romagna si stima che si verifichino circa tra 350 e 400 nuovi casi ogni anno. Il rischio di sviluppare un carcinoma ovarico nell'arco della vita è di circa l'1% tra le donne che vivono nei paesi sviluppati [20]. I carcinomi ovarici possono essere distinti in tumori di origine epiteliale, che rappresentano il 90% delle neoplasie, e in tumori ovarici germinali. La maggior parte dei tumori epiteliali interessa le donne in menopausa o peri menopausa, l'età media di insorgenza è di 63 anni, ma può abbassarsi in presenza di fattori di rischio ereditari che predispongono alla malattia. Oltre il 90% dei tumori ovarici viene diagnosticato in pazienti che hanno superato i 40 anni e il 30%-40% dopo i 65 anni [21]. I fattori che influenzano il rischio di sviluppare un carcinoma ovarico sono molteplici: fattori ormonali (menarca precoce e menopausa tardiva, nulliparità e infertilità rappresentano fattori di rischio mentre utilizzo di contraccettivi ormonali combinati e legatura della tube o salpingectomia sono fattori protettivi), fattori ambientali (esposizione ad asbesto, talco e obesità) e fattori eredo-familiari (mutazioni dei geni BRCA1 e BRCA2, BRIP1, RAD51C, RAD51D e dei geni del mismatch repair).

A causa dei sintomi aspecifici e della mancanza di strumenti efficaci per effettuare una diagnosi precoce, circa il 75-80% dei casi di tumore ovarico viene diagnosticato in uno stadio avanzato (stadio FIGO III-IV) [22]. Lo stadio di malattia alla diagnosi è il fattore più importante nel determinare la prognosi del tumore ovarico, altri fattori associati a una prognosi sfavorevole sono l'istotipo mucinoso, l'istotipo a cellule chiare poiché sono dotati di una minore chemio sensibilità e la presenza di residuo di malattia dopo la chirurgia citoriduttiva primaria. La presenza di mutazioni a carico dei

geni BRCA1 e BRCA2 invece è associata ad una prognosi più favorevole a causa della elevata chemio sensibilità e alle terapie di mantenimento [23]. La sopravvivenza globale a 5 anni si attesta intorno al 46% con importanti differenze legate allo stadio della malattia al momento della diagnosi (stadio I: 85-90%, stadio II: 57-70%, stadio III: 39-59%, stadio IV: 17%) [19]. Il carcinoma ovarico epiteliale può essere suddiviso in cinque gruppi principali in base alle sue caratteristiche morfologiche, immunoistochimiche e molecolari. Questi gruppi includono il carcinoma sieroso di alto grado, che rappresenta il 70% dei casi, il carcinoma endometriode che costituisce il 10%, il carcinoma a cellule chiare anch'esso al 10%, il carcinoma mucinoso al 3% e infine il carcinoma sieroso di basso grado che rappresenta meno del 5%. Ogni gruppo presenta differenze significative in termini di epidemiologia, fattori di rischio, modalità di diffusione, alterazioni genetiche, risposta alla chemioterapia e prognosi [22]. Il trattamento delle neoplasie ovariche prevede un'associazione di chirurgia e chemioterapia modulato a seconda dello stadio della malattia e delle condizioni cliniche della paziente. Il trattamento di prima scelta prevede la chirurgia citoreduttiva primaria seguita da un trattamento chemioterapico adiuvante e da una terapia di mantenimento. Nei casi in cui non sia possibile una citoreduzione ottimale in prima istanza la paziente viene sottoposta a un trattamento chemioterapico neoadiuvante, con lo scopo di ridurre la diffusione della malattia, seguita dalla rivalutazione chirurgica ed eventualmente dalla chirurgia d'intervallo o interval debulking surgery (IDS) [24].

2.3 Endometriosi e rischio di cancro

Una revisione sistematica e metanalisi di 49 studi condotta da Kvaskoff et al. ha evidenziato come l'endometriosi si associ a un rischio leggermente aumentato, seppur non statisticamente significativo, nella diagnosi di tumori. L' endometriosi è associata in particolare a un rischio più elevato di carcinoma ovarico (+1.2 %), soprattutto per quanto riguarda gli istotipi a cellule chiare ed endometriode, di carcinoma mammario e di carcinoma tiroideo (+0.5%) [25]. Sarria-Santamera et al. hanno evidenziato che l'endometriosi presenta un rischio maggiore di 2,66 volte di sviluppare un carcinoma ovarico, rispetto alla popolazione generale [26]. Inoltre, è stato stimato che il rischio di carcinoma ovarico nel corso della vita nelle donne con l'endometriosi sia del 2,5% [2]. Nella popolazione generale, le donne che utilizzano contraccettivi orali combinati hanno un rischio di sviluppare un carcinoma ovarico inferiore del 20%-30% rispetto a coloro che non l'hanno mai utilizzata [27]. Ciò è associato, anche nelle donne affette da endometriosi, ad un minor rischio di sviluppare tumori ovarici ed endometriali ma ad un maggior rischio di carcinoma della mammella e della cervice [28]. La trasformazione maligna dell'endometriosi si verifica nello 0,7-2,5% dei casi,

nella maggior parte dei casi (circa il 75%) la trasformazione neoplastica avviene nell'ovaio, solo nel 25% ciò si verifica su impianti di endometriosi localizzati al di fuori dell'ovaio [29].

2.4 Il carcinoma ovarico correlato all'endometriosi

La correlazione tra endometriosi e carcinoma ovarico è stata descritta per la prima volta da Sampson nel 1927 [30]. Il carcinoma ovarico correlato all'endometriosi o EROC (Endometriosis Related Ovarian Cancer) è definito dalla presenza di una delle seguenti condizioni:

1. presenza nello stesso ovaio di endometriosi e carcinoma ovarico;
2. presenza di endometriosi in un ovaio e di carcinoma ovarico nell'ovaio controlaterale;
3. presenza di carcinoma ovarico e di endometriosi pelvica;
4. dimostrazione di una transizione istologica da endometriosi a carcinoma;

I primi tre criteri sono stati definiti da Sampson, mentre il quarto criterio è stato proposto da Scott nel 1953. Dal punto di vista istopatologico, gli "endometriomi atipici" sono considerati i precursori degli EROC. L'endometriosi atipica è caratterizzata dalla presenza di atipia citologica e/o iperplasia. Thomas e Campbell hanno classificato l'endometriosi atipica sulla base dei seguenti criteri istologici: nucleo grande, ipercromatico o chiaro, con marcato pleomorfismo, ridotto rapporto citoplasma/nucleo e stratificazione cellulare. La presenza di iperplasia nell'epitelio ghiandolare è meno comune ma è descritta in alcuni endometriomi atipici [31]. Si stima che complessivamente circa l'8% degli endometriomi contenga una componente di endometriosi atipica [32]. L'endometriosi atipica rappresenta probabilmente una transizione dall'endometriosi benigna al carcinoma [33]. Infatti, sono stati osservati focolai di endometriosi atipica nel 61% dei casi di EROC [34]. Secondo uno studio di coorte giapponese, un numero piuttosto basso, circa lo 0,7%, delle pazienti con endometriosi ha sviluppato un carcinoma ovarico. Gli autori hanno analizzato i fattori di rischio correlati alla trasformazione tumorale riscontrando un'associazione con l'età avanzata, lo stato menopausale e un diametro della cisti superiore a 9 cm [35].

Tuttavia, al momento non esistono linee guida specifiche sull'età per iniziare la sorveglianza nelle donne asintomatiche affette da endometriosi, alcuni autori propongono una sorveglianza attiva delle lesioni endometriosiche a partire dai 35 anni [36]. Non ci sono indicazioni allo stato attuale per una chirurgia preventiva, gli endometriomi vengono sottoposti ad asportazione chirurgica quando presentano un aspetto ecografico atipico o un aumento di dimensioni nel tempo [17].

I carcinomi ovarici a cellule chiare ed endometrioidi sono istotipi frequentemente riscontrati in stretta contiguità alle lesioni endometriosiche, in particolare a quelle con componenti di endometriosi atipica, pertanto, è stato ipotizzato che l'endometriosi possa essere un precursore di questi istotipi [37]. In una metanalisi di 13 studi caso-controllo è stata evidenziata un'associazione tra endometriosi

e carcinoma ovarico a cellule chiare (OR=3.05, 95% CI=2.43-3.84, $p<0.0001$), carcinoma ovarico endometriode (OR=2.04, 95% CI=1.67-2.48, $p<0.0001$) e carcinoma sieroso di basso grado (OR=2.11, 95% CI=1.39-3.20, $p<0.0001$)[38]. Al contrario, non sono state riscontrate associazioni con i carcinomi ovarici mucinosi, i tumori ovarici borderline e i carcinomi ovarici sierosi di alto grado. I carcinomi ovarici a cellule chiare ed endometrioidi rappresentano rispettivamente il secondo e il terzo istotipo più frequente di carcinoma ovarico dopo i carcinomi sierosi di alto grado. È stato ipotizzato che i carcinomi ovarici a cellule chiare possano originare da cisti endometrioidiche preesistenti, mentre i carcinomi endometrioidi possano derivare da una metaplasia mülleriana ovarica, con diversi meccanismi di carcinogenesi e diversi precursori [39]. L'endometriosi atipica è presente nel 60-80% dei tumori associati all'endometriosi, ma è più frequentemente associata ai tumori a cellule chiare (36%) rispetto agli endometrioidi (23%) [40].

Un recente studio retrospettivo condotto da Bergamini et al. ha analizzato i dati clinici di 48 pazienti affette da EROC, di cui 26 carcinomi ovarici endometrioidi (54%) e 22 carcinomi ovarici a cellule chiare (46%) per valutare se vi fossero differenze tra i due istotipi a supporto di una differente origine. Una diagnosi di endometriosi pregressa è stata riscontrata più frequentemente nel gruppo di carcinomi a cellule chiare (32% vs 4%, $p = 0,01$). Le lesioni erano più frequentemente bilaterali nei carcinomi endometrioidi (35% vs 5%, $p = 0,01$). Le pazienti con carcinoma a cellule chiare hanno presentato più frequentemente uno stadio di malattia avanzato (41% vs 15%, $p = 0,04$). Inoltre, 10 pazienti affette da carcinoma ovarico endometriode (38%) hanno avuto una diagnosi di carcinoma endometriale sincro mentre nessuno delle pazienti con carcinoma ovarico a cellule chiare ha presentato questa neoplasia [41]. Tuttavia, i dati di questo studio devono essere interpretati con cautela per la natura retrospettiva e le esigue dimensioni del campione.

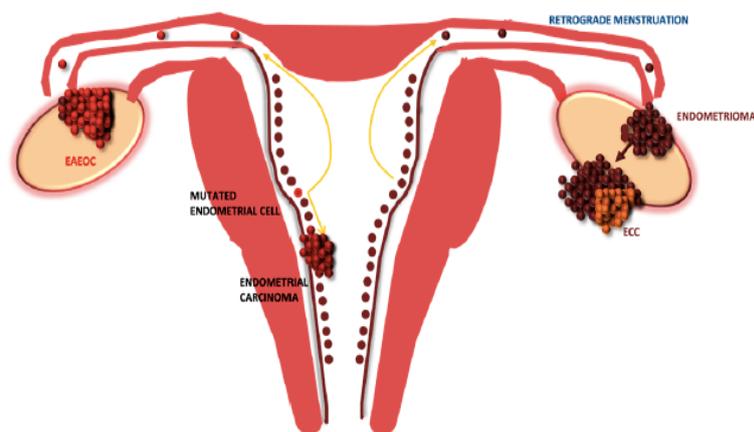


Figura 2. Dicotomia nell'istogenesi dei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi. Nei carcinomi ovarici endometrioidi si ipotizza che alla base della trasformazione neoplastica vi sia un'alterazione che determina una trasformazione sincrona in senso neoplastico del tessuto endometriale e dell'endometriosi ovarica mentre nei carcinomi ovarici a cellule chiare

chiare la trasformazione neoplastica avviene nel contesto della cisti endometriosa; Da Bergamini et al. *Diagnostics* 2023 [41]

Nei carcinomi a cellule chiare e nei carcinomi endometrioidi le mutazioni di TP53 e i difetti di ricombinazione omologa conseguenti a mutazioni dei geni BRCA1, BRCA2, RAD51D, BRIP1 sono rari [42]. L'attivazione degli oncogeni KRAS e PIK3CA e l'inattivazione dei geni oncosoppressori PTEN e ARID1A sono i meccanismi patogenetici più frequenti [43]. In particolare, studi di sequenziamento del genoma mediante Next Generation Sequencing (NGS) hanno riscontrato mutazioni dei geni ARID1A, PIK3CA, PPP2R1A e KRAS nei carcinomi ovarici a cellule chiare e mutazioni di PTEN, CTNNB1 e KRAS nei carcinomi ovarici endometrioidi [44,45]. Nei carcinomi endometrioidi sono descritte mutazioni del gene CTNNB1 che codifica per la β -catenina nel 16% - 53% dei casi, del gene PTEN nel 14-21% dei casi [46] e del gene ARID1A nel 30% dei casi [44]. Nei carcinomi a cellule chiare sono riportate mutazioni del gene PIK3CA nel 20-40% dei casi [47] e del gene ARID1A nel 15-61% dei casi [48]. Mutazioni del gene KRAS sono state riscontrate nel 20-30% degli EROC ma solo nel 3% dei tumori ovarici non associati ad endometriosi, a sostegno dell'ipotesi che le mutazioni KRAS abbiano un ruolo nella carcinogenesi degli EROC [49].

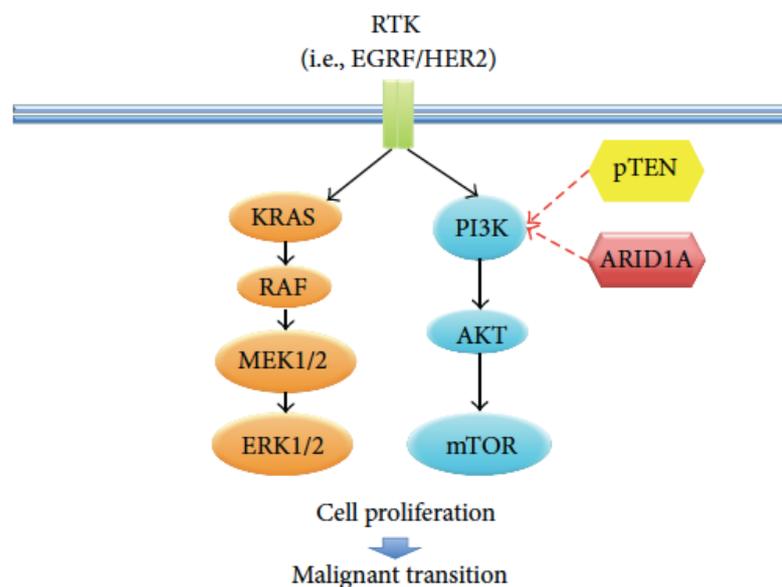


Figura 3. Pathways molecolari coinvolte nella trasformazione neoplastica dei tumori ovarici correlati all'endometriosi. Si assiste all'attivazione della pathway molecolare degli oncogeni KRAS e PI3KCA e all'inattivazione dei geni oncosoppressori PTEN e ARID1A; Da Grandi et al., *BioMed Research International* 2015 [30]

Inoltre, uno studio italiano ha suggerito che anche una ridotta espressione di hMLH1 e di PTEN potrebbero avere un ruolo nella cancerizzazione dell'endometriosi [50]. L'attivazione della via PIK3-AKT-mTOR, un rimodellamento aberrante della cromatina a causa delle mutazioni di ARID1A e l'inattivazione del segnale del recettore degli estrogeni (ER) α sembrano anch'essi svolgere un ruolo

nella carcinogenesi degli endometriomi [51]. Un deficit nella metilazione del promotore del recettore degli estrogeni β causa una sovra espressione di ER β nelle cellule stromali dell'endometriosi, che a sua volta sopprime l'espressione di ER α [52]. Un elevato rapporto ER β /ER α nelle cellule stromali dell'endometriosi porta ad una down-regolazione del recettore del progesterone (PR) e all'aumento dell'espressione della ciclossigenasi (COX)-2, con conseguente aumento dell'inflammazione. Una condizione di iperestrogenismo associata ad una infiammazione cronica potrebbe favorire la proliferazione e l'invasività delle cellule endometriali ectopiche [53]. Tra gli EROC vi sono inoltre differenze importanti nell'espressione dei recettori ormonali: l'istotipo a cellule chiare non esprime i recettori degli estrogeni (ER) e del progesterone (PR), mentre l'istotipo endometrioide esprime entrambi [33].

Nel carcinoma endometriale, la classificazione molecolare introdotta dal progetto di sequenziamento del genoma The Cancer Genome Atlas (TCGA) ha fornito un nuovo strumento per suddividere i tumori in sottogruppi prognostici indipendentemente dai tradizionali istotipo e grado. Le quattro categorie molecolari introdotte dal TCGA sono: carcinomi POLE-mutati (POLEmut), con deficit nell'espressione dei geni del mismatch repair o MMR-deficient (MMRd), con difetti nell'espressione di p53 (p53abn) e nessun profilo molecolare specifico (NSMP) [54]. Ciascuna di queste categorie molecolari ha delle raccomandazioni specifiche legate alla diversa prognosi, tanto che la nuova classificazione molecolare è stata integrata nelle linee guida per la gestione del carcinoma endometriale [55] e nella nuova stadiazione FIGO 2023 [56]. Data l'analogia tra carcinoma endometriale e carcinoma ovarico endometrioide e il ruolo cruciale della nuova classificazione molecolare negli algoritmi decisionali del carcinoma endometriale, alcuni autori hanno ipotizzato che la classificazione TCGA dei carcinomi endometriali possa essere rilevante anche nei tumori ovarici correlati all'endometriosi, in particolare negli istotipi endometrioidi [57,58]. Una metanalisi condotta da D'Alessandris et al. ha evidenziato che nei carcinomi ovarici endometrioidi i sottogruppi molecolari introdotti dal TCGA possono avere un valore prognostico come nei carcinomi endometriali endometrioidi, nonostante alcune differenze riguardanti la frequenza e le caratteristiche patologiche [59]. Infatti, questo studio ha evidenziato una prevalenza più elevata del gruppo NSMP e una prevalenza inferiore del gruppo MMRd nei carcinomi ovarici endometrioidi rispetto ai carcinomi endometriali endometrioidi. Ciò supporta la possibilità di utilizzare la classificazione TCGA per stratificare il rischio dei tumori ovarici endometrioidi, al fine di indirizzare la gestione della paziente. Uno studio retrospettivo condotto in Finlandia ha dimostrato la possibilità di applicare la classificazione molecolare TCGA anche all'istotipo a cellule chiare [60]. Gli autori hanno confermato l'esistenza delle quattro categorie molecolari TCGA anche nel carcinoma ovarico a cellule chiare oltre che nel carcinoma ovarico endometrioide. In entrambi questi sottogruppi, gli NSMP

(Non-Specific Molecular Profile) erano il sottogruppo più comune, rappresentando il 76% dei carcinomi a cellule chiare e il 60% degli istotipi endometrioidi, seguiti dalla classe p53abn (20% e 30%, rispettivamente). Il numero di tumori classificati come MMRd (Mismatch Repair Deficient) era inferiore, rappresentando il 3,5% dei carcinomi a cellule chiare e il 6,3% degli endometrioidi. I tumori POLEmut erano relativamente rari in entrambi i gruppi. Inoltre, sembra che i tumori POLEmut, MMRd e p53abn siano meno frequenti nell'istotipo a cellule chiare. Questo studio ha mostrato prognosi distinte per i sottogruppi molecolari in entrambi gli istotipi. In particolare, è emerso che la prognosi dei carcinomi ovarici a cellule chiare MMRd era favorevole, mentre quella degli istotipi endometrioidi MMRd era più sfavorevole. Inoltre, come atteso, è stata confermata una prognosi sfavorevole nei tumori p53abn in entrambi gli istotipi.

2.5 Carcinomi correlati all'endometriosi extra ovarica

Seppur con una frequenza inferiore (18-25% dei casi di carcinomi correlati all'endometriosi), la possibilità di cancerizzazione è stata descritta anche nell'endometriosi extra ovarica. La maggior parte dei carcinomi insorti su impianti di endometriosi extra ovarici si localizza a livello del setto rettovaginale e del colon. Localizzazioni meno frequenti includono la vulva, la vagina, il collo dell'utero, il corpo uterino (adenomiosi), le salpingi, la vescica, i parametri, i legamenti uterosacrali, l'ombelico, i linfonodi, la pleura e il retroperitoneo. In uno studio condotto da Stern et al. la cancerizzazione dell'endometriosi è stata riscontrata più frequentemente a livello degli endometriomi (5,6%) rispetto agli impianti endometrioidici extra-ovarici (1,6%) [61]. I carcinomi endometrioidi e a cellule chiare sono gli istotipi più frequenti e rappresentano l'80% dei tumori insorti su endometriosi extra ovarica ma sono stati descritti anche istotipi rari come sarcomi, carcinosarcomi o adenosarcomi. I tumori non epiteliali sembrano essere più frequentemente associati all'endometriosi extra-ovarica che all'endometriosi ovarica, infatti, gli adenosarcomi rappresentano la neoplasia più frequente nell'endometriosi extra-ovarica, dopo i carcinomi endometrioidi e a cellule chiare [32]. La menopausa, l'obesità e la terapia ormonale sostitutiva (TOS) rappresentano fattori di rischio per lo sviluppo di carcinomi correlati all'endometriosi extra ovarica [62]. La prognosi dipende dallo stadio del tumore e la sopravvivenza a 5 anni varia dall' 82% per le pazienti con tumore confinato nel sito di origine al 12% per le pazienti che presentano carcinosi peritoneale alla diagnosi [63]. Una review condotta da Gadducci e Zannoni ha descritto nel dettaglio le caratteristiche cliniche, patologiche e la prognosi delle neoplasie correlate all'endometriosi extra ovarica con un'analisi dettagliata dei diversi siti in cui l'insorgenza di questa patologia è più frequente: l'intestino, l'apparato urinario e le cicatrici chirurgiche [64].

I tumori intestinali associati all'endometriosi sono una patologia rara, la maggior parte di essi insorge in donne di età compresa tra i 30 e i 50 anni [65]. Il sigma e il colon-retto sono le localizzazioni più frequenti seguiti dall'intestino tenue, dal cieco e dall'appendice. I sintomi sono analoghi a quelli del cancro del colon: dolore addominale o pelvico, dischezia, dispareunia, ematochezia, rettoragia o melena, occlusione o perforazione intestinale. La colonscopia è l'esame diagnostico che nella maggior parte dei casi permette la diagnosi di questa patologia. Possono esistere difficoltà diagnostiche nella distinzione tra carcinoma associato all'endometriosi e carcinoma primitivo del colon, ed è necessaria la presenza di endometriosi circostante per supportare la diagnosi di tumore correlato all'endometriosi [66]. I tumori intestinali associati all'endometriosi invadono la parete del viscere dall'esterno, coinvolgendo quindi la sierosa e la sottosierosa, e talvolta anche la muscolaris propria e la sottomucosa, mentre la mucosa può essere regolare e non infiltrata mentre i carcinomi primitivi del colon hanno un modello di crescita opposta [65]. L'immunoistochimica può essere utile per la diagnosi differenziale: fino all'80-100% dei carcinomi endometrioidi sono positivi per CK7 e negativi per CK20, mentre il 75-95% dei carcinomi primitivi del colon sono negativi per CK7 e positivi per CK20 [64]. A causa della rarità di questi tumori non esiste un consenso sul trattamento ma, se possibile, la chirurgia citoreducente primaria dovrebbe prevedere la resezione di tutte le lesioni macroscopicamente visibili.

La review condotta da Gadducci e Zannoni ha riportato solo 11 casi di trasformazione maligna dell'endometriosi della vescica (7 carcinomi a cellule chiare, 3 carcinomi endometrioidi e un adenosarcoma) e 4 casi di neoplasie derivanti dall'endometriosi ureterale (tutti istotipi endometrioidi) [64]. I sintomi riportati in questi casi sono stati aumentata frequenza minzionale, incontinenza urinaria ed ematuria. Il trattamento di queste neoplasie è stato chirurgico seguito da un trattamento chemioterapico adiuvante a base di platino.

2.6 Carcinomi correlati all'endometriosi e sindrome di Lynch

La Sindrome di Lynch (LS) o HNPCC (Hereditary Non-Poliposis Colorectal Cancer) è una patologia ereditaria a carattere autosomico dominante che predispone il soggetto affetto allo sviluppo di neoplasie in diversi distretti (colon retto, endometrio, intestino tenue, ovaio, mammella, cute, pancreas, prostata, tumori uroteliali, tumori del SNC, tumori gastrici, tumori epato biliari). L'età di insorgenza di queste neoplasie è generalmente inferiore nei pazienti affetti da HNPCC rispetto ai casi sporadici. La causa di questa sindrome è rappresentata dalla presenza di una mutazione germinale patogenetica a carico di uno dei geni coinvolti nel sistema del mis-match repair (MSH 2, MSH 6, MLH 1, PMS 2, MLH 3, MSH 3) o di EPCAM che determina una mancata espressione di MSH 2.

Questo sistema è un complesso multienzimatico che presenta il compito di analizzare e correggere eventuali errori nella replicazione del DNA.

Il carcinoma ovarico nelle donne con LS rappresenta lo 0,9-2,7% dei tumori ovarici e il rischio cumulativo di sviluppare un carcinoma ovarico nel corso della vita per le pazienti affette varia tra il 6 e il 12% [67]. L'istotipo più frequentemente associato alla LS nel carcinoma ovarico è l'endometriode che risulta costituito dagli stessi sottotipi molecolari della sua controparte endometriale [58]. Il deficit nella riparazione dei mis-match (MMRd) è presente in circa il 10% - 12% dei tumori ovarici epiteliali ed è stata segnalata in tutti i sottotipi istologici, con una maggior rappresentazione nei carcinomi ovarici non sierosi. Il deficit nella riparazione dei mis-match (MMRd) presenta una frequenza del 13 % nei carcinomi ovarici endometrioidi, quindi, esiste un consenso secondo cui le pazienti affette da carcinoma ovarico endometriode dovrebbero essere testate per la sindrome di Lynch. La frequenza di MMRd nell'adenocarcinoma ovarico a cellule chiare risulta più bassa (attorno al 6%) [68].

L'incidenza di MMRd nei tumori sierosi varia dal 1% all'8%, con una significativa eterogeneità tra gli studi [69]. Le linee guida ASCO raccomandano di escludere la presenza di LS nei sottotipi istologici endometriode, mucinoso e a cellule chiare, che presentano la più elevata proporzione di MMRd rispetto alla controparte sierosa (19,2%, 16,9% e 11,5% rispettivamente) [70]. La patogenesi dei tumori associati all'endometriosi nelle pazienti con LS potrebbe essere correlata all'instabilità dei microsatelliti che aumenterebbe il rischio di cancerizzazione di una lesione endometriosa. In letteratura sono stati riportati casi di carcinomi sincroni insorti su lesioni endometriose, a livello endometriale e ovarico in pazienti con LS che presentavano un deficit concomitante di proteine del MMR nel cancro dell'endometrio, nel carcinoma ovarico e nell' endometriosi ovarica contigua suggerendo la possibilità di un'implicazione dei geni del mis match repair nella carcinogenesi associata all'endometriosi [71].

2.7 MiRNA nell'endometriosi e nei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi

I microRNA (miRNA) sono brevi sequenze di 19-22 nucleotidi prive di capacità codificante implicati nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione proteica [72]. I miRNA sono in grado di regolare complesse reti di segnalazione grazie alla loro capacità di influenzare la traduzione di geni codificanti. Nell'oncogenesi, i miRNA possono agire come oncogeni o oncosoppressori a seconda dei loro geni bersaglio e dal loro livello di espressione [72]. Da un punto di vista funzionale, i miRNA sono coinvolti nelle interazioni intercellulari, sia nel tessuto endometriale che negli impianti endometriosi [73]. Ipoteticamente, i miRNA potrebbero rappresentare indirettamente il microambiente cellulare che porta alla formazione degli impianti endometriosi. Pertanto, la loro

ricerca potrebbe contribuire a individuare l'endometriosi prima che le lesioni macroscopiche siano identificabili con le attuali tecniche diagnostiche. In una revisione sistematica in cui sono stati inclusi 71 studi, per un totale di 2045 pazienti, i miRNA che presentavano la differenza più ampia tra le pazienti affette da endometriosi e i controlli sono stati: miR-145, miR-191, miR-195, miR-21-5p, miR-106b-5p, miR-195-5p, miR-451a, miR-200c, miR-20a-5p e miR-15a-5p. I miRNA che presentavano una differenza intermedia tra pazienti e controlli sono stati: miR-146a rs2910164, miR-149 rs2292832, miR-16, miR-29c-3p, miR-451, miR-10b, miR-199a-3p, miR-205-5p/ZEB1, miR-519b-3p/PRRG4 e miR-423 rs6505162 [74].

Alterazioni nell'espressione dei miRNA sono state riscontrate anche nella genesi dei carcinomi ovarici. In particolare, la famiglia di miRNA miR-200 risulta coinvolta nel processo di metastatizzazione dei carcinomi ovarici. La famiglia di miRNA miR-148/152, miR-335, miR-1 e miR-34a-3p risultano frequentemente down regolati nel carcinoma ovarico, mentre miR-17-5p e miR-21-5p risultano up regolati. Infine, alcuni miRNA, come miR-200, miR-17, miR-34, miR-1, miR-155 e miR-21, presentano un'alterata espressione sia nell'endometriosi che nel carcinoma ovarico [10].

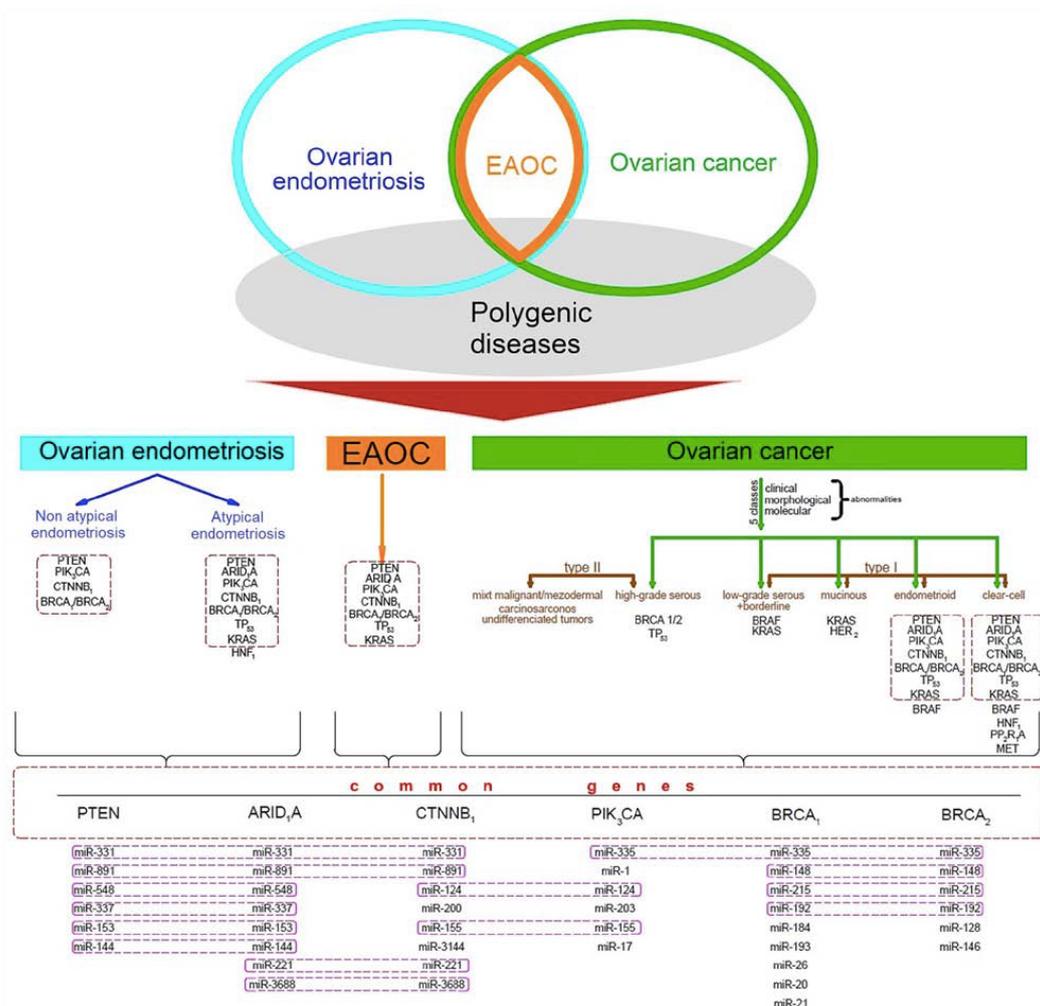


Figura 4. Geni mutati e miRNA disregolati nell'endometriosi, nei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi (EAOC) e nei carcinomi ovarici non correlati all'endometriosi. Da Gaia-Oltean et al., *Exp Ther Med* 2021[10]

2.8 Descrizione ecografica delle masse annessiali e rischio di malignità

La terminologia utilizzata per la descrizione ecografica delle masse annessiali è stata standardizzata dal gruppo IOTA nel 2000 [15]. Le tumefazioni annessiali sono classificate come: uniloculari, uniloculari solide, multiloculari, multiloculari solide o solide. Una tumefazione uniloculare presenta una sola concamerazione mentre quelle multiloculari sono suddivise da setti in più concamerazioni. In entrambi i casi non sono presenti componenti solide. Una componente solida è definita dalla presenza di tessuto solido che aggetta all'interno della cisti. Le papille sono componenti solide a tutti gli effetti e per essere definite tali devono presentare un'altezza maggiore o uguale a 3 mm. Le tumefazioni solide sono costituite per almeno l'80% da tessuto solido. Sulla base di queste caratteristiche è possibile attribuire un rischio di malignità alle lesioni annessiali pari allo 0.6% nelle cisti uniloculari, al 10% nelle multiloculari, al 33% nelle uniloculari solide, al 43% nelle multiloculari solide e al 65% nelle lesioni solide. Le altre caratteristiche da considerare sono il contenuto della cisti che può essere anecogeno, "low level", "ground glass", misto o emorragico, i profili esterni e i piani di clivaggio con le strutture pelviche circostanti e la presenza di setti, papille o componenti solide. Un altro aspetto cruciale è la vascolarizzazione che viene valutata mediante il Power Doppler (PD) con una metodica soggettiva semi quantitativa che attribuisce un punteggio da 1 a 4, dove 1 corrisponde a nessuna vascolarizzazione e 4 a una vascolarizzazione intensa. Ulteriori aspetti da considerare sono la presenza di coni d'ombra posteriori, indice di benignità, e la presenza di ascite ovvero liquido libero all'infuori dello scavo pelvico, indice di malignità.

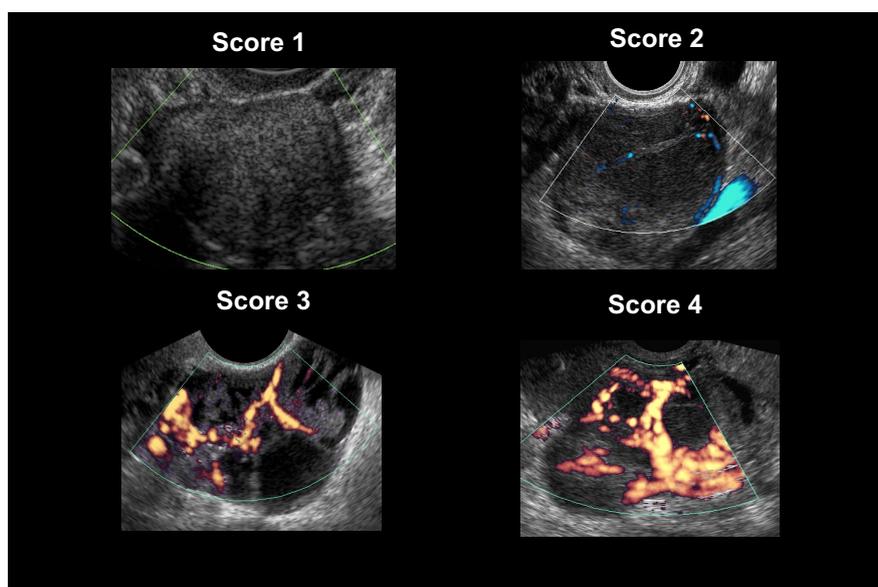


Figura 5. Vascolarizzazione delle lesioni annessiali valutata mediante l'utilizzo del Power Doppler. Color score (CS)1: nessuna vascolarizzazione; CS 2: scarsa vascolarizzazione; CS 3: discreta vascolarizzazione; CS 4: intensa vascolarizzazione.

Il gruppo IOTA ha messo a punto nel corso degli anni diversi modelli matematici in grado di predire il rischio di malignità di una lesione annessiale, il più recente è il modello Assessment of Different NEoplasias in the adneXa (ADNEX) che è stato sviluppato dall'analisi di circa 6000 pazienti reclutate in 24 centri in 10 paesi [75].

Questo modello, oltre a stimare il rischio di malignità di una lesione annessiale, è in grado di fornire un rischio relativo che essa sia un tumore ovarico borderline, un carcinoma ovarico primitivo in stadio iniziale, un carcinoma ovarico primitivo in stadio avanzato (II-IV) o una metastasi ovarica.

ADNEX prende in considerazione l'età della paziente, se il luogo in cui l'ecografia viene eseguita è un centro di riferimento per l'oncologia, il diametro massimo della lesione annessiale, il diametro massimo della componente solida di maggiori dimensioni, se sono presenti più di 10 concamerazioni, il numero di papille, la presenza di coni d'ombra, ascite e il dosaggio ematico del CA 125. L'AUC (Area Under the Curve) del modello ADNEX per la discriminazione di base tra tumori benigni e maligni è 0,943 (0,934-0,952). Utilizzando una soglia del 10% per prevedere la malignità, la sensibilità è stata del 96,5% e la specificità del 71,3%. L'AUC è stata di 0,85 per i tumori benigni rispetto ai tumori borderline, 0,92 per i tumori benigni rispetto al cancro di stadio I, 0,99 per i tumori benigni rispetto al cancro di stadio II-IV e 0,95 per i tumori benigni rispetto alle metastasi ovariche. Le AUC di convalida tra i sottotipi maligni variavano tra 0,71 e 0,95. Il modello ha mostrato una discreta discriminazione tra i carcinomi ovarici in stadio I e i tumori borderline (AUC 0,75) e tra il carcinoma ovarico in stadio I e le metastasi ovariche (AUC di convalida 0,71). È stato in grado di distinguere con accuratezza i carcinomi ovarici in stadio II-IV dagli altri sottotipi (AUC per il cancro di stadio II-IV rispetto ai tumori borderline= 0,95, rispetto al cancro di stadio I= 0,87 e rispetto alle metastasi ovariche =0,82).

2.9 Le caratteristiche ecografiche dei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi

Le caratteristiche ecografiche di diverse patologie ginecologiche sono descritte nella serie di articoli "Imaging in Gynecological Disease" che descrive le caratteristiche cliniche ed ecografiche di queste patologie utilizzando i termini e le definizioni dell'International Ovarian Tumor Analysis (IOTA) [15]. All'interno di "Imaging in Gynecological Disease" Moro et al. hanno pubblicato i risultati di uno studio multicentrico retrospettivo che ha preso in analisi le immagini ecografiche di 239 pazienti con diagnosi istologica di carcinoma endometriode [76]. Due lesioni erano uniloculari (0,8%), 3 (1,3%) multiloculari, 37 (15,5%) uniloculari-solide, 115 (48,1 %) multiloculari-solide e 82 (34,3%)

solide. Il diametro medio delle lesioni era di 102,5 mm (range, 20-300 mm) e il diametro medio della componente solida di maggiori dimensioni 63 mm (range, 9-300 mm). Nel 29,3% delle tumefazioni erano presenti papille. 188 tumori (78,7%) erano unilaterali. In 49 casi (20,5%), il cancro è stato classificato come correlato all'endometriosi, e in 11 (23,9%) di queste pazienti era presente anche un carcinoma endometriale sincrono. I tumori ovarici endometrioidi correlati all'endometriosi, rispetto ai carcinomi endometrioidi non correlati all'endometriosi, presentavano più spesso papille (46,9% (23/49) vs 24,7% (47/190)), erano più frequentemente unilaterali (91,8% (45/49) vs 75,3% (143/190)) e meno frequentemente associati ad ascite (6,1% (3/49) vs 28,4% (54/190)) e a versamento nel Douglas (24,5% (12/49) vs 48,9% (93/190)). Le lesioni multiloculari o multiloculari-solide erano suddivise in un minor numero di concamerazioni negli EROC rispetto ai non EROC (presenza di due o tre concamerazioni nel 46,4% vs 18,9%). Inoltre, i tumori endometrioidi associati all'endometriosi erano più spesso lesioni uniloculari-solide (28,6% vs 12,1%) e meno frequentemente solide (12,2% vs 40,0%).

Utilizzando la “pattern recognition”, i tumori endometrioidi EROC sono spesso descritti come cisti uniloculare solide o multiloculari solide con papille, mentre i carcinomi endometrioidi non associati all'endometriosi spesso presentano una componente solida intrappolata all'interno delle concamerazioni di una cisti multiloculare solida, conferendo alla lesione un aspetto “a coccarda”.

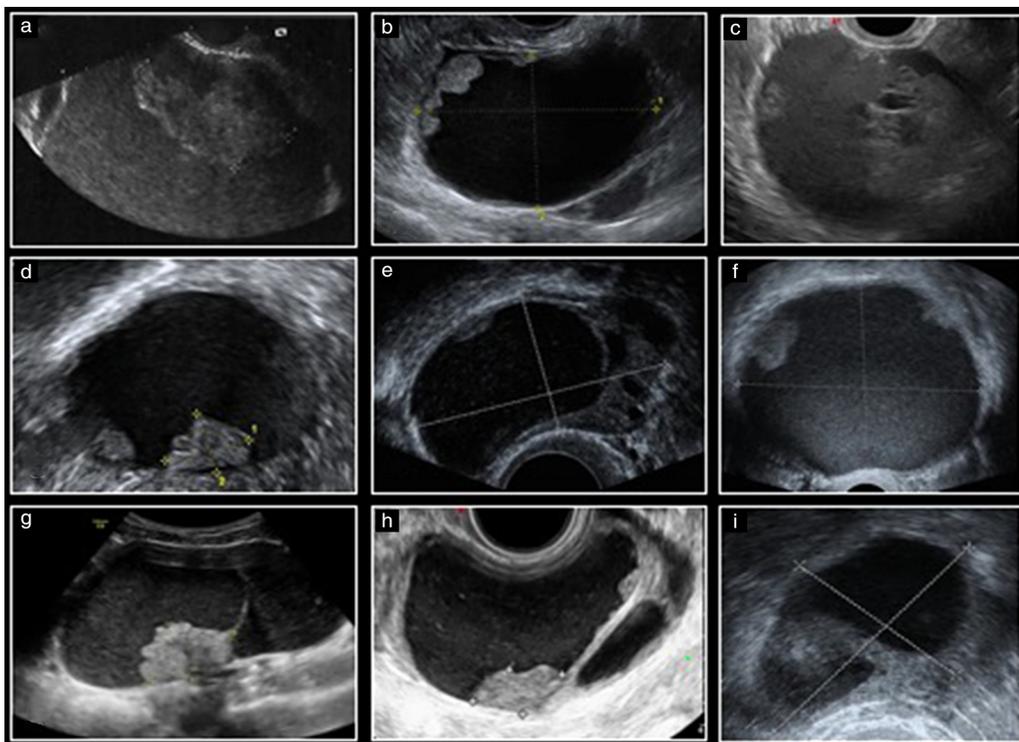


Figura 6. Immagini ecografiche di carcinomi endometrioidi con evidenza di tumore che si sviluppa dall'endometriosi all'esame istologico. I carcinomi sono stati descritti come tumefazioni uniloculari solide (a-f) o multiloculari solide (g-i). Da Moro et al., *Ultrasound Obstet Gynecol* 2018 [76]

Dal punto di vista clinico, le pazienti con EROC avevano livelli mediani più bassi del CA125 sierico rispetto alle pazienti con carcinomi endometrioidi non associati ad endometriosi (64 U/mL vs 256,5 U/mL), e gli EROC erano più spesso diagnosticati in stadio I (81,6% (40/49) vs 52,4% (99/189)) ed erano più frequentemente tumori di basso grado (34,7% (17/49) vs 23,5% (40/170)).

Pozzati et al., sempre nell'ambito di "Imaging in Gynecological Disease", hanno pubblicato i risultati di uno studio retrospettivo multicentrico condotto su una casistica di 152 pazienti con diagnosi istologica di carcinoma ovarico a cellule chiare [77]. L'età mediana delle 152 pazienti era di 53,5 anni (range, 28-92 anni) e il 42,8% delle pazienti erano in premenopausa. La maggior parte dei tumori sono stati diagnosticati in stadio FIGO I (60,5%). La maggior parte delle lesioni (128/152, 84, 2%) era unilaterale. Il CA125 sierico mediano era di 79,0 U/mL (range, 4,1-6410,0 U/mL). Tutti i carcinomi a cellule chiare contenevano componenti solide, il diametro maggiore mediano della componente solida di maggiori dimensioni era di 69 mm (range, 10-200 mm). Il diametro medio delle lesioni era 117 mm (range, 25-310 mm). Il 34,9% erano lesioni uniloculari-solide, il 41,4% multiloculari-solide e il 23,7% solide. Nel 38,2% dei casi erano presenti papille e la maggior parte dei tumori presentava un numero di papille superiore a tre. La maggior parte di esse era vascolarizzata. L' endometriosi è stata riscontrata nel 41,5% delle pazienti, in 24 casi (18,5%) il patologo ha valutato che il carcinoma a cellule chiare si fosse sviluppato dall'endometriosi, in 10 casi (7,7%) era presente endometriosi nell'ovaio affetto da carcinoma a cellule chiare ma non erano presenti segni di sviluppo del cancro dall'endometriosi e in 20 casi (15,4%) sono state segnalate lesioni endometrioidiche nell'ovaio controlaterale o nella pelvi. Non sono state riscontrate differenze significative nelle caratteristiche cliniche delle pazienti con carcinoma a cellule chiare correlato all'endometriosi rispetto a quelle con carcinoma a cellule chiare non insorto su endometriosi ad eccezione dell'età alla diagnosi (età mediana 47,5 vs 55,0 anni). Il contenuto cistico nella maggior parte dei casi è stato descritto come "low level" (50/115, 43,5%) ma nelle pazienti con carcinoma a cellule chiare associato ad endometriosi il contenuto della cisti presentava più frequentemente un'ecogenicità "ground glass" (50,0% vs 16,5%). A parte l'ecogenicità del contenuto cistico, non sono state riscontrate differenze nelle caratteristiche ecografiche tumori a cellule chiare che si sviluppavano dall'endometriosi e tumori a cellule chiare senza endometriosi. Utilizzando la "pattern recognition", non è stato possibile individuare uno specifico pattern ecografico per i carcinomi ovarici a cellule chiare.

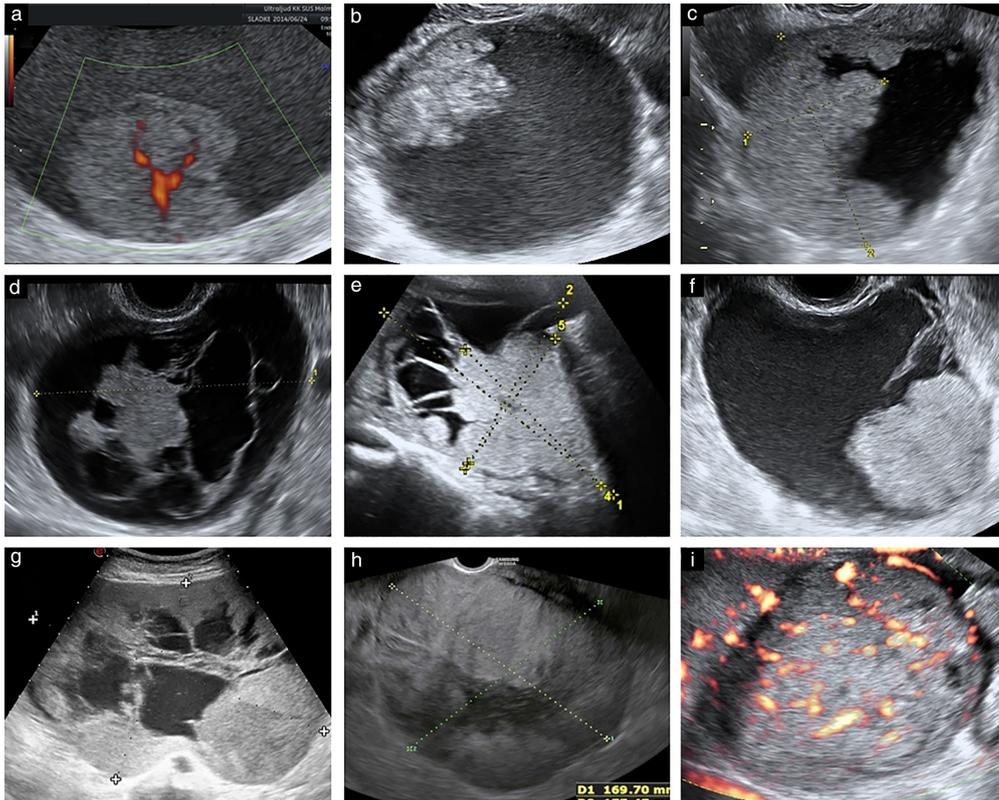


Figura 7. Immagini ecografiche di carcinomi a cellule chiare in pazienti con endometriosi pelvica confermata istologicamente, descritte come cisti uniloculari solide (a–c), cisti multiloculari solide (d–f) o tumefazioni solide (g–i). Da Pozzati et al., *Ultrasound Obstet Gynecol* 2018 [77]

3. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Lo scopo di questa tesi è approfondire, attraverso l'analisi di una casistica di pazienti afferenti ad un centro di riferimento per il trattamento delle neoplasie ovariche, il tema dei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi. Secondo i criteri di Sampson, possiamo definire EROC (Endometriosis Related Ovarian Cancer) qualsiasi carcinoma associato a endometriosi ovarica o pelvica. Nel 1953 Scott propone un quarto criterio che prevede la dimostrazione di una transizione istologica da endometriosi a carcinoma. Nella nostra casistica abbiamo distinto gli EROC in due gruppi: i carcinomi ovarici correlati all'endometriosi definiti dal criterio di Scott ovvero quei tumori in cui sia evidente una transizione istologica dall'endometriosi al carcinoma (EROC correlati) e i carcinomi definiti dai criteri di Sampson in cui sia presente endometriosi pelvica o ovarica ma non sia identificabile una transizione da endometriosi a carcinoma (EROC associati).

Questo studio presenta due obiettivi principali:

1. Determinare la percentuale di tumori ovarici correlati o associati all'endometriosi rispetto alla percentuale totale di carcinomi ovarici trattati nel nostro centro
2. Confrontare le caratteristiche cliniche ed ecografiche dei carcinomi non EROC, EROC associati ed EROC correlati al fine di identificare possibili differenze tra i gruppi

Gli obiettivi secondari sono i seguenti:

1. Valutare l'espressione dei marcatori tumorali (CA 125, CA 19.9) negli EROC correlati, associati e nei carcinomi ovarici non EROC
2. Identificare la presenza di profili mutazionali specifici identificati mediante un pannello NGS negli EROC correlati e classificarli secondo i quattro sottotipi molecolari del TCGA
3. Identificare la presenza di miRNA disregolati negli EROC correlati rispetto all'endometriosi coesistente

4. MATERIALI E METODI

4.1 Disegno dello studio

Questo è uno studio osservazionale, prospettico di coorte, monocentrico, non sponsorizzato, non farmacologico e presenta l'impiego di tessuti umani in vitro. La coorte di pazienti arruolata proviene dagli ambulatori dell'U.O.C. Ginecologia Oncologica, IRCCS Azienda Ospedaliero Universitaria di Bologna, diretta dal Prof. De Iaco. Lo studio ha ricevuto l'approvazione del Comitato Etico in data 21/10/2021 (codice interno CE 923/2021/Oss/AOUBo).

In occasione della prima visita ginecologica ambulatoriale tutte le pazienti con masse annessiali sospette per carcinoma ovarico sono state sottoposte ad una stadiazione clinica comprensiva di ecografia transvaginale e transaddominale eseguita da un ecografista esperto. Sono state adottate le tecniche e la terminologia IOTA per descrivere le masse annessiali [15] e in caso di bilateralità è stata descritta la lesione di maggiori dimensioni o quella con caratteristiche ecografiche meno rassicuranti. Gli esami ecografici sono stati realizzati con un ecografo Voluson E10 o Voluson E8. La frequenza delle sonde vaginali variava tra 5,0 e 9,0 MHz, mentre quella delle sonde addominali variava tra 3,5 e 5,0 MHz. Successivamente, dopo aver completato la stadiazione con altri esami strumentali (TC o PET), le pazienti sono state sottoposte ad un intervento chirurgico nel caso in cui la diffusione della malattia fosse compatibile con una citoreduzione completa, in caso contrario veniva avviata una chemioterapia neoadiuvante con successiva chirurgia di intervallo. Nei casi in cui l'esame estemporaneo ha posto la diagnosi di EROC, sono state eseguite ulteriori indagini istologiche e molecolari. Lo studio non ha previsto modificazioni del work up preoperatorio, intraoperatorio e post-operatorio. Le informazioni cliniche e patologiche sono state raccolte in un database elettronico studio specifico e, nel corso del follow-up, gli eventi (recidive e decessi) sono stati registrati in questo database. Lo studio è a carattere non interventistico, pertanto, le analisi istologiche e molecolari sono state effettuate su tessuto tumorale prelevato in corso d'intervento chirurgico come previsto dal normale iter assistenziale.

4.2 Popolazione dello studio

In un arco temporale che si estende dal 01/11/2021 al 30/06/2023, sono state sequenzialmente arruolate 94 pazienti affette da carcinoma ovarico afferenti agli ambulatori dell'U.O.C. di Ginecologia Oncologica dell'IRCCS Azienda Ospedaliero Universitaria di Bologna diretta dal Prof. De Iaco. Di queste, 46 pazienti erano affette da EROC, mentre le rimanenti 48 erano affette da carcinoma ovarico non EROC. In particolare, 29 pazienti presentavano un carcinoma ovarico correlato all'endometriosi, in cui è stato possibile identificare una transizione istologica da endometriosi a carcinoma, 17 presentavano un carcinoma ovarico associato all'endometriosi, quindi un tumore ovarico e una

diagnosi istologica di endometriosi a livello pelvico o ovarico ma senza una evidenza di trasformazione dell'endometriosi in carcinoma.

Tutte le pazienti che rispondevano ai criteri di inclusione hanno fornito il proprio consenso informato. I criteri di inclusione comprendevano: diagnosi istologica di carcinoma ovarico; esecuzione di ecografia transvaginale e transaddominale presso gli ambulatori della U.O.C. Ginecologia Oncologica dell'IRCCS Azienda Ospedaliero Universitaria di Bologna; età compresa tra 18 e 90 anni e ottenimento del consenso informato.

Al contrario, i criteri di esclusione erano i seguenti: pregressa radioterapia pelvica, gravidanza in atto, diagnosi istologica ottenuta tramite biopsia e non tramite intervento chirurgico, assenza o ritiro del consenso informato.

4.3 Analisi istopatologica

I campioni di tessuto prelevati in corso di intervento chirurgico sono stati consegnati al reparto di Anatomia Patologica per l'inclusione in blocchetti di paraffina (FFPE) come da normale iter diagnostico. Successivamente, i campioni sono stati sezionati in fettine sottili con uno spessore di tre micrometri utilizzando un microtomo. Queste fettine sono state quindi montate su vetrini per consentire la successiva esecuzione di colorazioni specifiche e l'analisi al microscopio. Questa procedura ha garantito la preparazione accurata dei campioni per l'analisi patologica e ha consentito la valutazione dettagliata delle caratteristiche morfologiche dei tessuti. L'analisi immunohistochimica è una tecnica utilizzata per rilevare specifiche proteine all'interno dei tessuti mediante l'uso di anticorpi che si legano a tali proteine. In questo studio l'analisi immunohistochimica ha valutato l'espressione di PTEN, p53, MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, ARID1A, Beta catenina, ER, PR.

Le regioni di interesse sono state individuate e contornate sotto la supervisione di un esperto patologo. Successivamente, è stata eseguita l'estrazione dell'RNA solo dalle regioni identificate come contenenti le patologie di interesse. Questo approccio ha consentito di identificare le regioni in cui erano presenti endometriosi, endometriosi atipica o carcinoma ovarico correlato all'endometriosi, garantendo che l'analisi fosse mirata alle aree rilevanti.

4.4 Estrazione di DNA e RNA

Tutti i campioni FFPE sono stati conservati negli archivi di Anatomia Patologica e due esperti patologi hanno esaminato i preparati per confermare la diagnosi. L'esame ha incluso oltre il 70% di cellule tumorali. Quando questa percentuale non veniva rispettata, i preparati tessutali venivano macro-dissezionati per eliminare la contaminazione delle componenti non tumorali e garantire che almeno il 70% dei campioni fosse costituito da cellule tumorali [78].

Il DNA e l'RNA sono stati estratti da sezioni FFPE, dopo la selezione dell'area di interesse da parte del patologo su un vetrino di riferimento. Gli acidi nucleici sono stati estratti dalle aree indicate come "tumore" utilizzando il kit RecoverAll™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). È stato utilizzato il kit RecoverAll per isolare sia DNA che RNA perché permette di utilizzare la stessa sezione di campione per entrambe le estrazioni, facendo due estrazioni parallele.

4.5 Analisi di Next Generation Sequencing

I tessuti prelevati sono stati sottoposti ad un'analisi utilizzando un approccio integrato che combina l'applicazione di un algoritmo immunohistochimico e l'utilizzo di un pannello di Next Generation Sequencing (NGS). L'algoritmo di classificazione dei carcinomi ovarici EROC correlati è riportato in Figura 8.

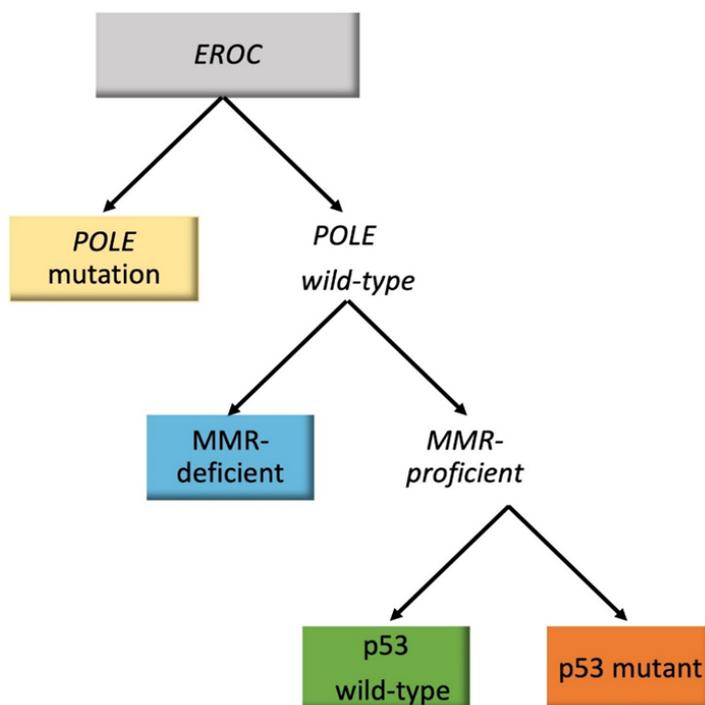


Figura 8. Algoritmo di classificazione dei tumori EROC correlati

Questo approccio combinato tra immunohistochimica e NGS ha consentito di effettuare un'analisi patologica e molecolare completa, permettendo l'identificazione dei sottogruppi molecolari dei carcinomi EROC correlati, seguendo i criteri definiti nel The Cancer Genome Atlas (TCGA) [79,80]. Per il sequenziamento mediante NGS, gli acidi nucleici sono stati estratti e utilizzati per preparare le librerie di ampliconi necessarie. Queste librerie sono state create mediante l'impiego di un pannello sviluppato internamente nel laboratorio di patologia molecolare del nostro ospedale, che comprende importanti marcatori molecolari frequentemente mutati in questi tipi di cancro come *ARID1A*, *BRAF*, *cKIT*, *CTNNB1*, *HRAS*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *POLE* e *TP53*. I risultati ottenuti da questo processo

analitico sono stati successivamente elaborati e interpretati utilizzando software specializzati, tra cui Ion Reporter (versione 5.18, Thermo Fisher Scientific) e Integrative Genomics Viewer 2.12, al fine di ottenere una visione completa e accurata delle caratteristiche molecolari dei campioni analizzati [81–84].

4.6 Analisi dell'espressione differenziale dei miRNA

È stata valutata la profilazione globale dei miRNA. Le librerie di cDNA sono state preparate utilizzando il kit per librerie miRNA QIAseq (Qiagen). In breve, le librerie di RNA sono state preparate a partire da 50 ng di RNA seguendo il protocollo del produttore. Le librerie sono state valutate per qualità e quantità utilizzando un kit per DNA ad alta sensibilità su un sistema TapeStation (Agilent); Le librerie di cDNA barcodate sono state raggruppate per una concentrazione di 4 nM e la concentrazione effettiva è stata nuovamente verificata sullo stesso strumento Agilent. I campioni sono stati sequenziati su una piattaforma NextSeq 500 high-output (Illumina, San Diego, CA) con letture singole da 75 bp.

Per valutare le differenze nei miRNA disregolati tra i tessuti in cui era presente endometriosi ed EROC, abbiamo utilizzato il pacchetto R DESeq2 [85]. I conteggi dei miRNA sono stati importati in R Studio [86]. Abbiamo eliminato i miRNA con una bassa espressione nei campioni, richiedendo almeno dieci conteggi in almeno un numero di campioni pari al sottogruppo più piccolo dell'analisi stessa. Il gruppo endometriosi è stato impostato come gruppo di riferimento. Il pacchetto DESeq2 fornisce metodi per testare l'espressione differenziale tramite l'uso di modelli lineari generalizzati binomiali negativi; le stime di dispersione e i logaritmi dei fold change incorporano distribuzioni prior data-driven. Abbiamo applicato una correzione per le comparazioni multiple utilizzando l'approccio di Benjamini-Hochberg [87,88]. Questo metodo è stato impiegato per affrontare il problema delle comparazioni multiple durante l'analisi statistica dei dati. La correzione di Benjamini-Hochberg controlla il tasso di falsi positivi quando si eseguono test statistici multipli e aiuta a identificare in modo più accurato le associazioni significative tra le variabili [87,88]. Questo approccio ci ha consentito di mitigare il rischio di errori dovuti alle molte confrontazioni effettuate durante l'analisi dei dati. I risultati sono stati riportati con \log_2 fold change insieme al valore p-value adjusted. Per l'Analisi delle Componenti Principali (PCA) [89], abbiamo utilizzato i dati normalizzati tramite il metodo VST (Variance Stabilizing Transformation) in R [90]. Questo metodo calcola una trasformazione di stabilizzazione della varianza (VST) dalla relazione dispersione-media stimata e quindi trasforma i dati di conteggio (normalizzati tramite divisione per i fattori di dimensione o fattori di normalizzazione), producendo una matrice di valori che sono approssimativamente omoschedastici (hanno varianza costante lungo l'intervallo dei valori medi). La trasformazione normalizza anche rispetto alle dimensioni della libreria. Successivamente, abbiamo creato un grafico delle prime due

componenti ottenute dalla PCA. I miRNA ottenuti dall'analisi utilizzando DESeq2 sono stati rappresentati graficamente mediante un *volcano plot*, una visualizzazione comunemente utilizzata per evidenziare le differenze nell'espressione genica. Per la creazione di questo tipo di grafico, abbiamo sfruttato il pacchetto R EnhancedVolcano [91]. Questo pacchetto consente di generare in modo efficace dei grafici che mostrano i miRNA con significative variazioni di espressione tra i gruppi in studio. I miRNA con p-values significativamente bassi e fold change elevati sono evidenziati in modo da facilitare l'identificazione dei candidati rilevanti per l'analisi differenziale.

4.7 MiRNA pathway analysis

Per l'analisi dei pathway influenzati dai miRNA, abbiamo selezionato solo i miRNA con un valore di p corretto (p-value adjusted) inferiore a 0,05. Per condurre questa analisi, abbiamo utilizzato il software MiEAA (miRNA Enrichment Analysis and Annotation) [92]. MiEAA è un tool che esegue l'analisi di sovra rappresentazione e l'analisi di arricchimento dei set di miRNA, simile all'Analisi di Arricchimento di Set di Geni [93]. MiEAA fornisce inoltre una vasta gamma di funzionalità relative alle categorie di miRNA. Questo strumento include complessivamente oltre 14.000 set di miRNA, tra cui pathway, malattie, organi e geni bersaglio. Nel nostro studio, abbiamo selezionato l'opzione Gene Ontology (GO) per l'analisi dei pathway [94,95]. GO è un sistema di annotazione biologica che fornisce una struttura gerarchica e controllata per descrivere le funzioni genetiche e biologiche dei geni e delle loro prodotte proteine. È un importante strumento utilizzato nella bioinformatica e nella biologia computazionale per analizzare e interpretare i dati molecolari, in particolare quelli derivati dalla genomica e dalla proteomica. L'obiettivo principale di GO è standardizzare la descrizione delle funzioni biologiche in modo che i ricercatori possano confrontare e interpretare i risultati delle loro ricerche in modo più accurato e significativo.

Il sistema GO suddivide le funzioni genetiche e biologiche in tre categorie principali:

Processi biologici: Questa categoria si riferisce a processi biologici o eventi molecolari che si verificano all'interno di un organismo. Ad esempio, il ciclo cellulare, la fotosintesi o il metabolismo dei lipidi sono processi biologici.

Funzioni molecolari: Questa categoria descrive le attività biochimiche o molecolari svolte da una proteina o da un gene. Ad esempio, una proteina può essere coinvolta in attività enzimatiche specifiche come la fosforilazione o la legatura del DNA.

Componenti cellulari: Questa categoria specifica la localizzazione subcellulare in cui una proteina o un gene svolge la sua funzione. Ad esempio, una proteina può essere localizzata nel nucleo, nel citoplasma o nella membrana cellulare.

Ogni categoria è ulteriormente suddivisa in termini di ontologia gerarchica, in cui le categorie più specifiche sono collegate alle categorie più generali tramite relazioni padre-figlio. Questa struttura

gerarchica consente di navigare attraverso le informazioni GO in modo da poter comprendere meglio le funzioni biologiche dei geni e delle proteine di interesse [94,95].

4.8 Analisi dei target dei miRNA

Per identificare i geni bersaglio specifici regolati dai miRNA risultati significativamente disregolati, abbiamo utilizzato i dati forniti da TargetScan per identificare i potenziali geni bersaglio dei miRNA in questione [96–98]. Abbiamo selezionato i geni di particolare interesse per i quali abbiamo determinato i miRNA che agiscono come loro regolatori. Infine, abbiamo incrociato l'elenco dei miRNA identificati attraverso questa analisi con il nostro set di dati risultati significativi dalla analisi di espressione differenziale per identificare i miRNA che erano comuni.

4.9 Analisi statistica

La normalità della distribuzione dei dati è stata esaminata con il test di Kolmogorov-Smirnov. Le variabili continue sono state espresse come media \pm deviazione standard o mediana con intervallo interquartile, mentre le variabili categoriche sono state espresse in percentuale. Per le variabili continue, sono stati effettuati confronti tra i tre gruppi con l'analisi della varianza ANOVA e con il test di Bonferroni per le comparazioni multiple, mentre per le variabili categoriche è stato utilizzato il test del Chi-quadro o il test di Fisher. Un valore di $p \leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi sono state condotte con SPSS versione 28.0 [SPSS Inc., Chicago, IL, USA], versione per Microsoft Windows. Per generare le curve ROC (Receiver Operating Characteristic) è stato usato il pacchetto R pROC [99]. Per determinare il valore soglia ottimale per la discriminazione tra i gruppi, abbiamo utilizzato l'indice di Youden. Inoltre, abbiamo calcolato una serie di indicatori di performance, tra cui specificità, sensibilità, accuratezza, valore predittivo negativo (VPN) e il valore predittivo positivo (VPP), al fine di valutare l'efficacia del nostro modello di discriminazione. La specificità misura la capacità del modello di classificare correttamente le istanze negative. In altre parole, rappresenta la proporzione di veri negativi rispetto al totale delle istanze negative. Una specificità più alta indica che il modello ha una migliore capacità di evitare falsi positivi quando classifica gli esempi negativi. La sensibilità invece misura la capacità del modello di individuare correttamente le istanze positive. Rappresenta la proporzione di veri positivi rispetto al totale delle istanze positive. Una sensibilità più alta indica che il modello ha una migliore capacità di individuare correttamente gli esempi positivi. L'accuratezza rappresenta la proporzione di previsioni corrette fatte dal modello rispetto al totale delle previsioni. È un indicatore generale della capacità di classificazione del modello. Il valore predittivo negativo misura la proporzione di veri negativi tra tutte le istanze predette come negative dal modello. Questo parametro indica la capacità del modello di evitare la classificazione errata delle istanze negative. Il valore predittivo positivo misura la

proporzione di veri positivi tra tutte le istanze predette come positive dal modello. Questo parametro indica la capacità del modello di fare previsioni corrette sulle istanze positive.

5. RISULTATI

5.1 Caratteristiche cliniche della popolazione

In questo studio prospettico, abbiamo reclutato un totale di 94 pazienti affette da carcinoma ovarico. Tra queste, 48 (51%) hanno ricevuto una diagnosi di carcinoma ovarico non correlato e non associato all'endometriosi (non EROC), 17 (18%) di carcinoma ovarico associato all'endometriosi (presenza di carcinoma ovarico e diagnosi istologica di endometriosi a livello pelvico o dell'ovaio omo o controlaterale) e 29 (31%) di carcinoma ovarico correlato all'endometriosi (con riscontro di una transizione istologica da endometriosi a carcinoma). Le caratteristiche cliniche della popolazione in studio sono riportate nella Tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche cliniche della popolazione

	Non EROC	EROC associato	EROC correlato	Totale	p-value
n, %	48 (51%)	17 (18%)	29 (31%)	94 (100%)	
Età, anni (media ± DS)	65,1±11,8	60,8±9,9	57,4±10,2	61,9±11,4	0,014
BMI, kg/m2 (media ± DS)	25,1±5,2	24,5±3,3	24,8±5,1	24,9±5,1	0,893
Menopausa (n, %)					0,079
Si	41 (85,4%)	13 (76,5%)	17 (58,6%)	71 (75,5%)	
No	7 (14,6%)	3 (17,6%)	10 (34,5%)	20 (21,3%)	
Non noto	0	1 (5,9%)	2 (6,9%)	3 (3,2%)	
Pregresse gravidanze (n, %)					0,331
Si	37 (77,1%)	13 (76,5%)	18 (62,1%)	68 (72,3%)	
No	11 (22,9%)	4 (23,5%)	11 (37,9%)	26 (27,7%)	
Terapia ormonale sostitutiva (n, %)					0,790
Si	5 (10,4%)	1 (5,9%)	2 (6,9%)	8 (8,5%)	
No	43 (89,6%)	16 (94,1%)	27 (93,1%)	86 (91,5%)	
Contracezione ormonale (n, %)					0,139
Si	1 (2,1%)	0	3 (10,3%)	4 (4,3%)	
No	47 (97,9%)	17 (100%)	26 (89,7%)	90 (95,7%)	
Comorbidità (n, %)					0,263
Si	33 (68,8%)	8 (47,1%)	17 (58,6%)	58 (61,7%)	
No	15 (31,3%)	9 (52,9%)	12 (41,4%)	36 (38,3%)	
Pregressa endometriosi (n, %)					0,004
Si	0	1 (5,9%)	6 (20,7%)	7 (7,4%)	
No	48 (100%)	16 (94,1%)	23 (79,3%)	87 (92,6%)	
Pregresse neoplasie (n, %)					0,537
Si	6 (12,5%)	4 (23,5%)	4 (13,8%)	14 (14,9%)	
No	42 (87,5%)	13 (76,5%)	25 (86,2%)	80 (85,1%)	
Tipo di neoplasia (n, %)					0,650
Mammella	3 (50%)	2 (50%)	1 (25%)	6 (42,9%)	
Endometrio	0	0	1 (25%)	1 (7,1%)	
Tiroide	1 (16,7%)	0	1 (25%)	2 (14,3%)	
Altro	2 (33,3%)	2 (50%)	1 (25%)	5 (35,7%)	
Familiarità neoplastica (n, %)					0,456
Si	28 (58,3%)	12 (70,6%)	15 (51,7%)	55 (58,5%)	
No	20 (41,7%)	5 (29,4%)	14 (48,3%)	39 (41,5%)	
Tipo di neoplasia, familiarità (n, %)					0,033
Mammella	18 (60%)	5 (41,7%)	3 (20%)	26 (45,6%)	
Ovaio	2 (6,7%)	1 (8,3%)	1 (6,7%)	4 (7%)	
Endometrio	0	2 (16,7%)	0	2 (3,5%)	
Colon	2 (6,7%)	3 (25%)	2 (13,3%)	7 (12,3%)	
Pancreas	1 (3,3%)	0	1 (6,7%)	2 (3,5%)	
Altro	7 (23,3%)	1 (8,3%)	8 (53,3%)	16 (28,1%)	

n=numero di pazienti; DS: deviazione standard; EROC: Endometriosis Related Ovarian Cancer; BMI: indice di massa corporea

L'età media al momento della diagnosi è risultata inferiore nelle pazienti con carcinoma ovarico correlato all'endometriosi (57,4 anni) e in quelle con carcinoma ovarico associato all'endometriosi (60,8 anni) rispetto alle pazienti con carcinoma ovarico non EROC (65,1 anni). Il test di Bonferroni è stato condotto per confermare la significatività della differenza osservata e il risultato ottenuto conferma che esiste una differenza statisticamente significativa tra i carcinomi non EROC e gli EROC correlati (Tabella 2). Non è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa nel numero di pazienti in premenopausa nel gruppo affetto da carcinomi ovarici correlati all'endometriosi (34,5% dei casi) rispetto al gruppo dei carcinomi ovarici non EROC (14,6% dei casi). La differenza diventa statisticamente significativa se si raggruppano i carcinomi ovarici correlati e associati all'endometriosi (EROC associati ed EROC correlati) e si confrontano con il gruppo dei carcinomi ovarici non EROC (65,2% contro 85,4% delle pazienti in menopausa al momento della diagnosi, p 0,039). Non sono emerse differenze tra i tre gruppi riguardo a pregresse gravidanze e all'utilizzo di terapie ormonali. Nessuna differenza rilevante è stata evidenziata per quanto riguarda le comorbidità e l'anamnesi oncologica personale. L'anamnesi oncologica familiare, al contrario, ha mostrato una distribuzione differenziata di patologie neoplastiche tra i gruppi. In particolare, il carcinoma della mammella risultava più frequente nelle famiglie delle pazienti affette da carcinomi ovarici non EROC, mentre il carcinoma dell'endometrio e del colon avevano un'incidenza maggiore tra i familiari delle pazienti con carcinoma ovarico associato all'endometriosi.

Tabella 2. Test *t* di Bonferroni per confronti multipli

Variabile dipendente			P value
Età alla diagnosi (anni)	non EROC	EROC associato	0,525
		EROC correlato	0,012
	EROC associato	non EROC	0,525
		EROC correlato	0,944
	EROC correlato	non EROC	0,012
		EROC associato	0,944

EROC: Endometriosis Related Ovarian Cancer

5.2 Caratteristiche ecografiche delle tumefazioni annessiali

L'aspetto ecografico delle tumefazioni annessiali è stato descritto utilizzando la terminologia introdotta dal gruppo IOTA nel 2000 con lo scopo di standardizzare la descrizione delle lesioni [15]. I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 3.

Tabella 3. Caratteristiche ecografiche delle tumefazioni annessiali.

	Non EROC (n=48)	EROC associato (n=17)	EROC correlato (n=29)	Totale (n=94)	p-value
Lesione annessiale (n, %)					0,162
Presente	46 (95,8%)	15 (88,2%)	29 (100%)	90 (95,7%)	
Assente	2 (4,2%)	2 (11,8%)	0	4 (4,3%)	
Lateralità lesione (n, %)					0,037
Unilaterale	19 (41,3%)	10 (66,7%)	20 (69%)	49 (54,4%)	
Bilaterale	27 (58,7%)	5 (33,3%)	9 (31%)	41 (45,6%)	
Diametro medio lesione, mm (media ± DS)	92 ± 57,1	95,2 ± 94,1	91,3 ± 33,1	92,3 ± 58,2	0,977
Caratteristiche lesione (n, %)					0,150
Multiloculare	4 (8,7%)	2 (13,3%)	0	6 (6,7%)	
Uniloculare solida	1 (2,2%)	1 (6,7%)	5 (17,2%)	7 (7,8%)	
Multiloculare solida	18 (39,1%)	4 (26,7%)	12 (41,4%)	34 (37,8%)	
Solida	23 (50%)	8 (53,3%)	12 (41,4%)	43 (47,8%)	
Color score (n, %)					0,734
1	3 (6,5%)	1 (6,7%)	3 (10,3%)	7 (7,8%)	
2	4 (8,7%)	2 (13,3%)	3 (10,3%)	9 (10%)	
3	25 (54,3%)	6 (40%)	18 (62,1%)	49 (54,4%)	
4	14 (30,4%)	6 (40%)	5 (17,2%)	25 (27,8%)	
Numero di componenti solide (n, %)					0,926
1	33 (76,7%)	10 (76,9%)	22 (75,9%)	65 (76,5%)	
2	1 (2,3%)	1 (7,7%)	1 (3,4%)	3 (3,5%)	
≥3	8 (18,6%)	2 (15,4%)	6 (20,7%)	16 (18,8%)	
Diametro componente solida di maggiori dimensioni, mm (media ± DS)	55,2 ± 24,6	44,9 ± 24,4	61,9 ± 32,9	55,9 ± 27,9	0,184
Numero di concamerazioni (n, %)					0,826
≤10	12 (60%)	5 (71,4%)	8 (61,5%)	25 (62,5%)	
≥10	8 (40%)	2 (28,6%)	5 (38,5%)	15 (37,5%)	
Ascite (n, %)					0,474
Presente	12 (25%)	3 (17,6%)	4 (13,8%)	19 (20,2%)	
Assente	36 (75%)	14 (82,4%)	25 (86,2%)	75 (79,8%)	
Versamento pelvico (n, %)					0,023
Presente	23 (47,9%)	2 (11,8%)	9 (31%)	34 (36,2%)	
Assente	25 (52,1%)	15 (88,2%)	20 (69%)	60 (63,8%)	
Spessore endometriale, mm (media ± DS)	4,39 ± 4,16	3,53 ± 2,69	8,35 ± 11,7	5,45 ± 7,4	0,050
Valutazione soggettiva (n, %)					0,180
Benigna	0	1 (6,7%)	0	1 (1,1%)	
Borderline	5 (10,9%)	3 (20%)	3 (10,3%)	11 (12,2%)	
Maligna	41 (89,1%)	11 (73,3%)	26 (89,7%)	78 (86,7%)	
Valutazione IOTA ADNEX (n, %)					0,014
Benigna	4 (8,7%)	5 (33,3%)	1 (3,4%)	10 (11,1%)	
Borderline	1 (2,2%)	1 (6,7%)	5 (17,2%)	7 (7,8%)	
Maligna stadio I	5 (10,9%)	0	2 (6,9%)	7 (7,8%)	
Maligna stadio II-IV	36 (78,3%)	9 (60%)	21 (72,4%)	66 (73,3%)	

n=numero di pazienti; EROC: Endometriosis Related Ovarian Cancer; DS: deviazione standard

Le tumefazioni annessiali nei carcinomi ovarici associati o correlati all'endometriosi, sono risultate unilaterali nel 66,7% e nel 69% dei casi, rispettivamente. Nei carcinomi ovarici non EROC, le lesioni erano bilaterali nel 58,7% dei casi. Un'altra caratteristica delle lesioni associate o correlate all'endometriosi è la presenza di versamento nel Douglas, osservata nel 11,8% e nel 31% dei casi,

rispettivamente, rispetto al 47,9% dei casi nei tumori non EROC. Per quanto riguarda la presenza di ascite, invece, non sono state rilevate differenze.

Lo spessore endometriale è risultato maggiore nelle pazienti affette da carcinoma ovarico correlato all'endometriosi (media 8,35 mm) rispetto agli altri due gruppi (carcinomi non EROC e EROC associati) in cui lo spessore medio era <5 mm.

L'applicazione del modello ADNEX per la previsione del rischio di malignità di una lesione ha dimostrato una maggiore accuratezza nei carcinomi ovarici non EROC, con l'89% dei casi in cui la lesione è stata classificata come maligna, rispetto ai carcinomi associati e correlati all'endometriosi, in cui la lesione è stata classificata come maligna nel 60% e 79% dei casi, rispettivamente. Ciò può essere giustificato dalla maggiore incidenza percentuale di carcinomi non EROC tra le masse annessiali su cui il modello è stato sviluppato. Non sono state riscontrate differenze significative tra i gruppi nella valutazione soggettiva della natura della lesione (maligna, borderline o benigna) da parte di un operatore esperto. Nel gruppo dei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi sono presenti carcinomi a cellule chiare (figura 9), endometrioidi (figura 10) e simil mesonefrici.

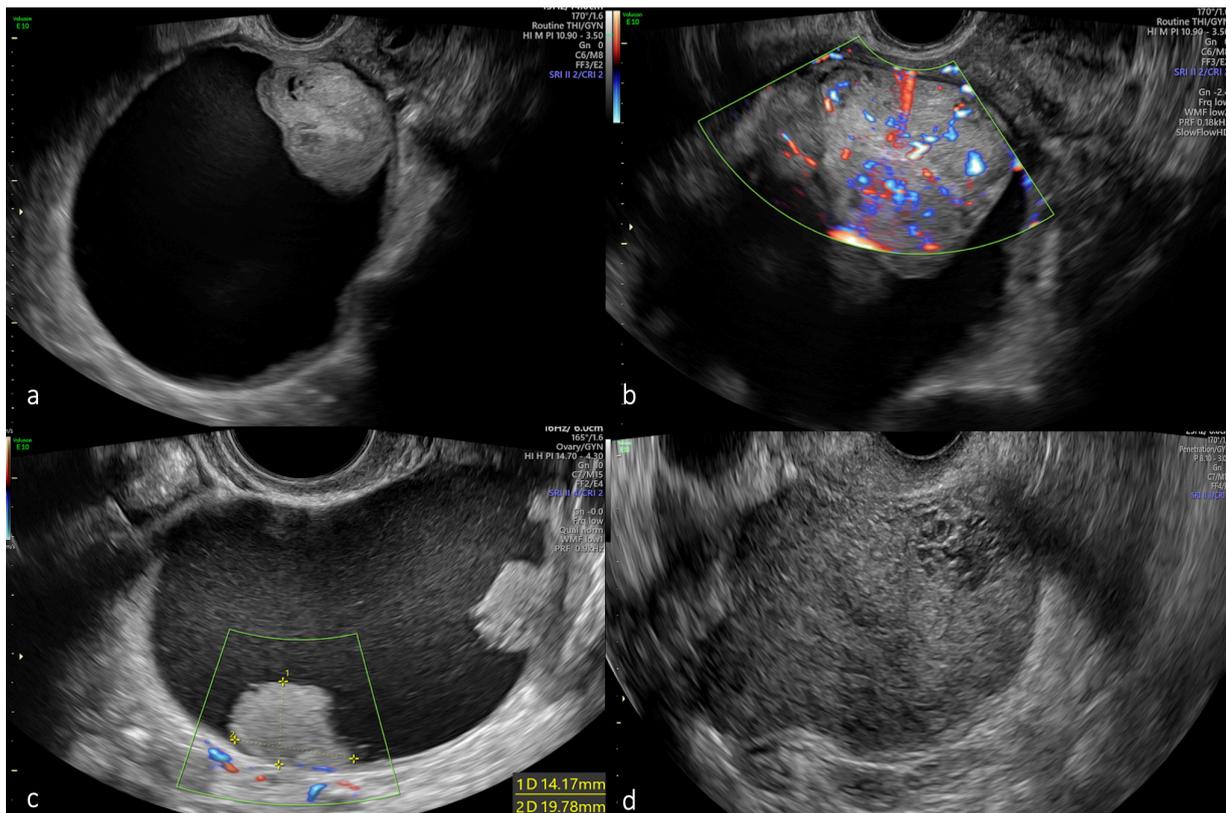


Figura 9. Carcinomi ovarici a cellule chiare correlati all'endometriosi descritti come tumefazioni uniloculari solide (a-c) o solide (d)

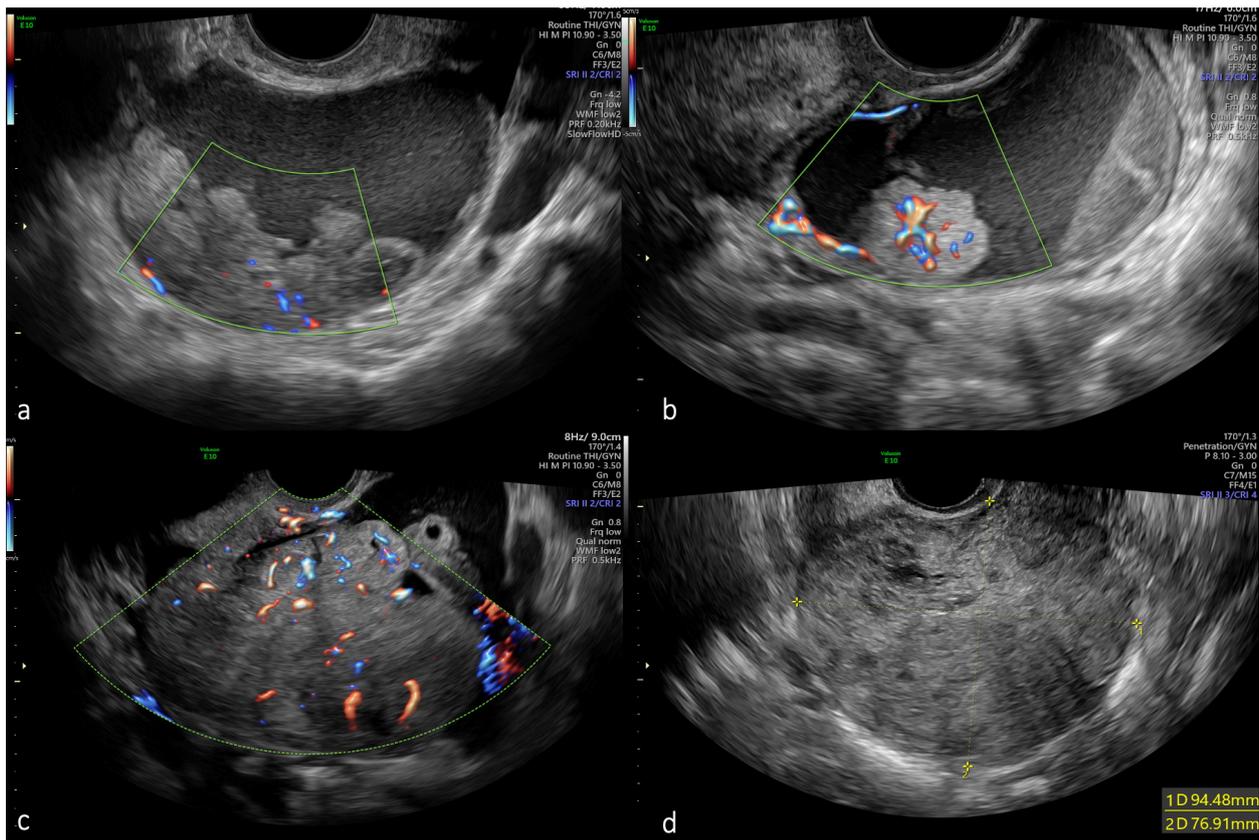


Figura 10. Carcinomi ovarici endometrioidi correlati all'endometriosi descritti come tumefazioni uniloculari solide (a,b) o solide (c,d)

Le caratteristiche ecografiche dei carcinomi simil mesonefrici non sono mai state descritte in letteratura. In questo studio abbiamo reclutato 6 casi di carcinoma ovarico simil mesonefrico e abbiamo potuto fare alcune osservazioni sull'aspetto ecografico di questa rara patologia: le lesioni erano tutte solide o multiloculari solide, più frequentemente unilaterali (nell'83% dei casi), con un diametro medio di 66 mm. Tali tumefazioni presentavano nella maggior parte dei casi una discreta vascolarizzazione al Power Doppler (CS 3) e in tutti i casi sono state classificate come maligne dall'ecografista che ha eseguito l'esame. Tutte le lesioni mostravano una ecogenicità non uniforme ed erano iperecogene o ipo-isoecogene con aree iperecogene rotondeggianti e mal definite che ricordano la consistenza dello zucchero filato o del cotone idrofilo e che, per questo motivo, abbiamo definito "cotton candy" (figura 11). Nella nostra casistica i carcinomi ovarici simil mesonefrici non si associano all'ascite, ma nel 33% dei casi erano associati a versamento nel Douglas.

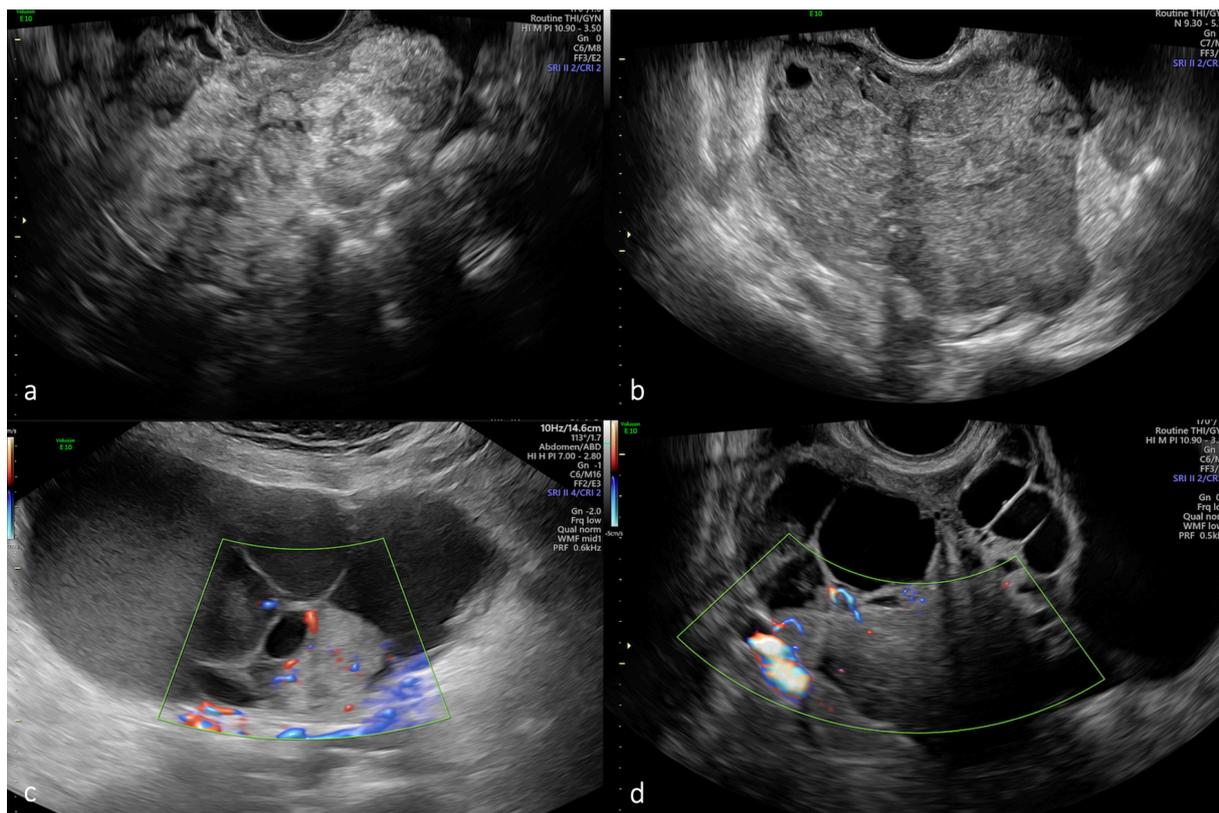


Figura 11. Carcinomi ovarici simil mesonefrici correlati all'endometriosi descritti come tumefazioni solide (a,b) o multiloculari solide (c,d)

Tra i carcinomi ovarici associati all'endometriosi abbiamo identificato carcinomi sierosi di alto e basso grado e adenocarcinomi mucinosi di tipo intestinale (figura 12) mentre nei carcinomi non correlati e non associati all'endometriosi sono presenti carcinomi sierosi di alto, grado di basso grado, mucinosi e indifferenziati (figura 13).

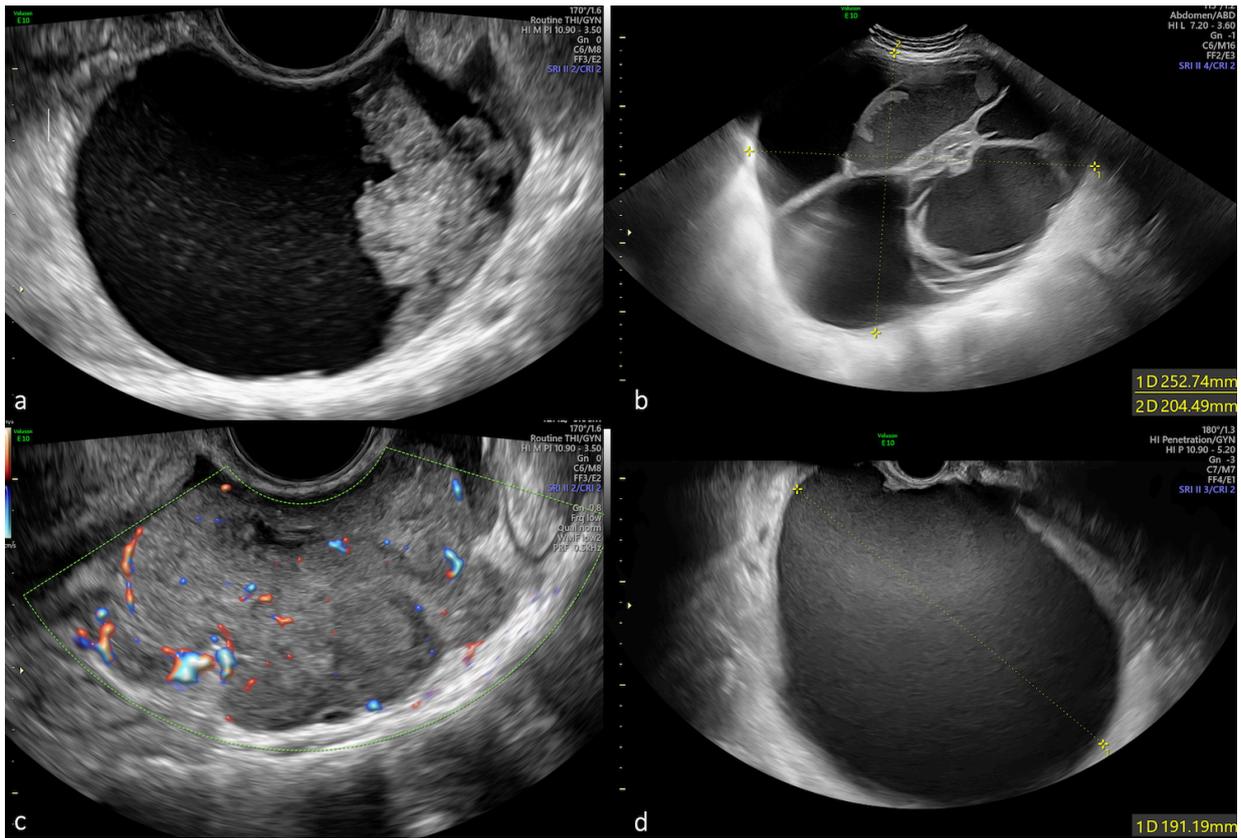


Figura 12. Carcinomi ovarici associati all'endometriosi: sieroso di basso grado (a), adenocarcinoma mucinoso di tipo intestinale (b), sieroso di alto grado (c,d)

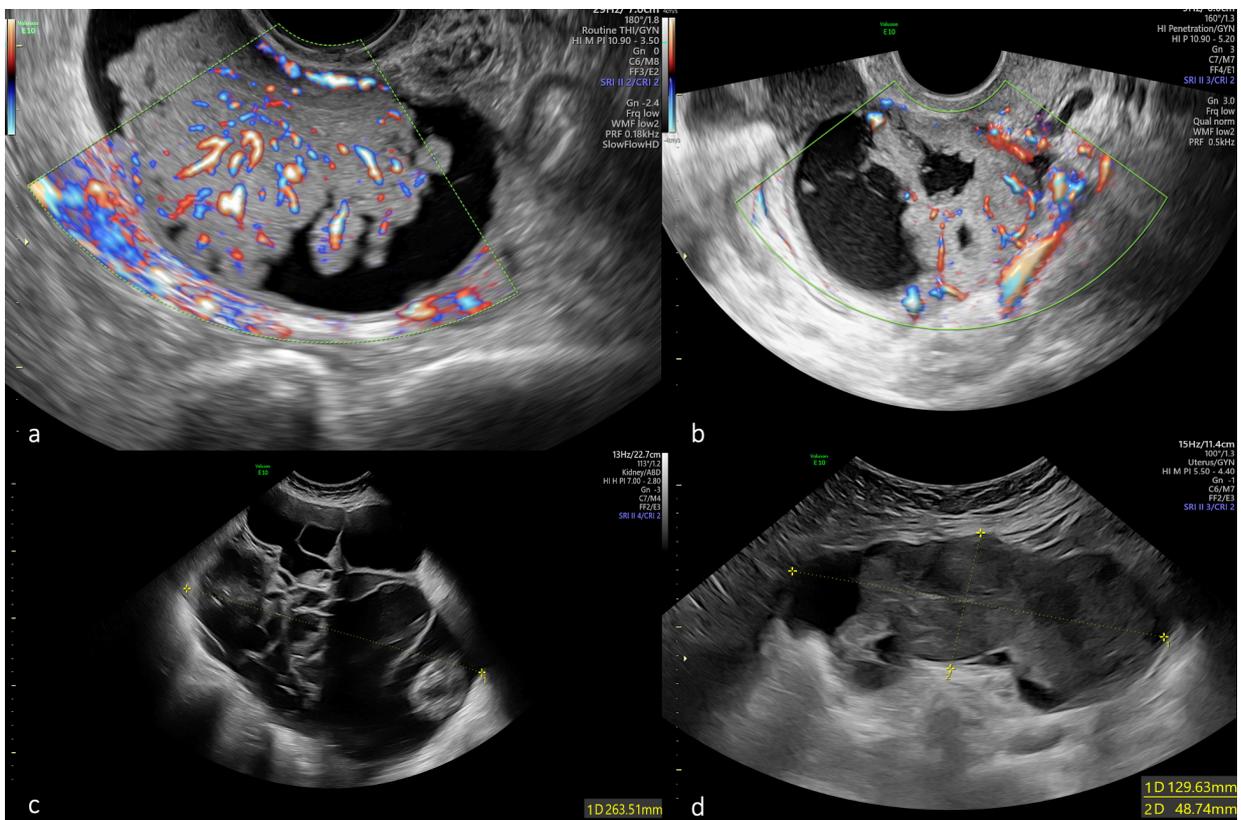


Figura 13. Carcinomi ovarici non correlati e non associati all'endometriosi: sieroso di alto grado (a,b,d), adenocarcinoma mucinoso di tipo intestinale (c)

5.3 Marcatori tumorali

I valori medi dei marcatori tumorali CA 125 e CA 19.9 pretrattamento sono riportati nella Tabella 4. Per quanto riguarda l'espressione del CA 125, non sono emerse differenze tra i tre gruppi. Al contrario, il CA 19.9 ha mostrato valori più elevati nei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi (con una media di 756 U/ml) rispetto agli altri due gruppi, in cui i valori medi si mantenevano entro i limiti di norma.

Tabella 4. Espressione dei marcatori tumorali CA 125 e CA 19.9

	Non EROC (n=48)	EROC associato (n=17)	EROC correlato (n=29)	Totale (n=94)	p-value
CA 125 pre, U/mL (media ± DS)	486,4 ± 657,9	1320 ± 3004,3	411,9 ± 604,5	614,2 ± 1412,1	0,071
CA 19,9 pre, U/mL (media ± DS)	18,55 ± 21,8	12,7 ± 11,6	756,21 ± 1949,4	247,5 ± 1129,3	0,012

U/mL: unità per millilitro; DS: deviazione standard; n: numero di pazienti; EROC: Endometriosis Related Ovarian Cancer

Il test di Bonferroni per confronti multipli ha confermato una significatività statistica tra i carcinomi correlati all'endometriosi e i carcinomi non EROC come evidenziato nella Tabella 5.

Tabella 5. Test *t* di Bonferroni per confronti multipli.

Variabile dipendente			p value
CA 19.9 pre (U/mL)	non EROC	EROC associato	1,000
		EROC correlato	0,015
	EROC associato	non EROC	1,000
		EROC correlato	0,083
	EROC correlato	non EROC	0,015
		EROC associato	0,083

U/mL: unità per millilitro; DS: deviazione standard; n: numero di pazienti; EROC: Endometriosis Related Ovarian Cancer

Dato che nel gruppo dei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi il valore massimo del CA 19.9 raggiungeva i 10.287 U/ml e la deviazione standard presentava un valore elevato ($\pm 1949,4$) abbiamo condotto ulteriori analisi per valutare se questo valore potesse essere l'unico responsabile della differenza osservata.

Nella Tabella 6 viene presentata la distribuzione dei valori di CA 19.9 pretrattamento nei diversi percentili (25[^],50[^],75[^]). Da questa analisi emerge che nei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi, il 50% delle pazienti presentava un valore superiore a 88 U/ml, mentre solo il 25% presentava un valore inferiore a 18 U/ml. Negli altri due gruppi solo il 25% presentava un valore superiore a 19,5 U/ml negli EROC associati e superiore a 28 U/ml nei non EROC; pertanto, la presenza di una differente distribuzione tra i gruppi, indipendente dai valori più elevati, è stata ulteriormente confermata. Nella Figura 14 è mostrata la differenza di espressione del CA 19.9 tra i tre gruppi.

Tabella 6. Valori medi e percentili del CA 19.9 pretrattamento nei tre gruppi.

non EROC	n	Valido	47
		Mancante	1
	Media	18,55	
	Minimo	1	
	Massimo	83	
	Percentili	25	4,00
		50	10,00
75		28,00	
EROC associato	n	Valido	17
		Mancante	0
	Media	12,76	
	Minimo	1	
	Massimo	42	
	Percentili	25	3,00
		50	11,00
75		19,50	
EROC correlato	n	Valido	29
		Mancante	0
	Media	756,21	
	Minimo	1	
	Massimo	10287	
	Percentili	25	18,00
		50	88,00
75		552,50	

n: numero di pazienti; EROC: Endometriosis Related Ovarian Cancer

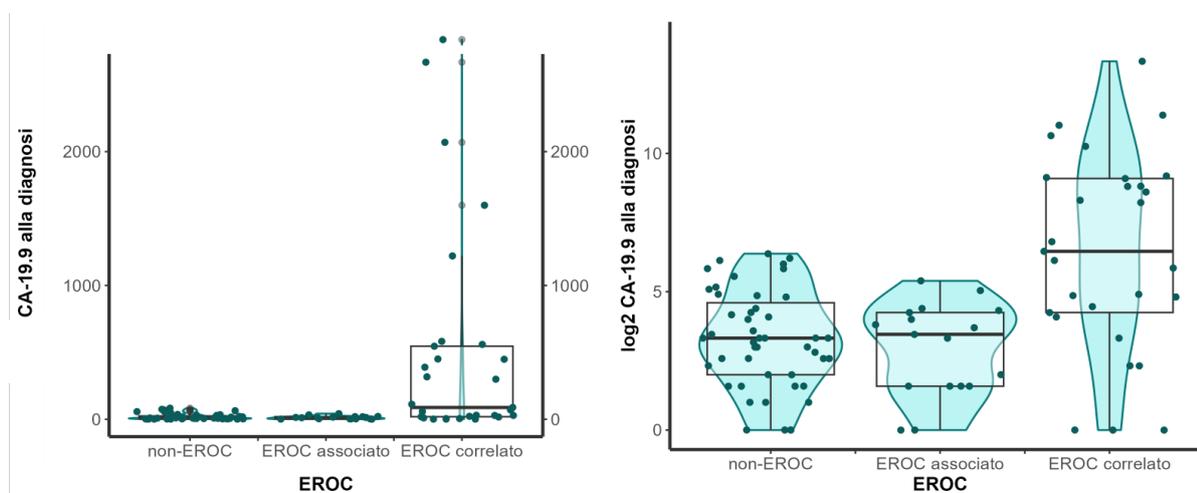


Figura 14. Espressione del marcatore tumorale CA 19.9 nei tre gruppi di carcinomi: non EROC, EROC associato ed EROC correlato. EROC: Endometriosis Related Ovarian Cancer

La performance diagnostica del CA 19.9 nel discriminare i carcinomi ovarici correlati all'endometriosi dai carcinomi associati e dai carcinomi non correlati e non associati all'endometriosi è riportata nella Tabella 7.

Tabella 7. Performance diagnostica del CA 19.9 nel distinguere tra EROC correlato, EROC associato e non EROC

	Threshold	Specificità	Sensibilità	Accuratezza	VPN	VPP
EROC correlato vs EROC associato	21,5	0,88	0,72	0,78	0,65	0,91
EROC correlato vs non EROC	85,5	1	0,52	0,82	0,77	1
EROC correlato vs non EROC correlato (EROC associato + non EROC)	57,5	0,94	0,59	0,823	0,83	0,81

VPN: valore predittivo negativo; VPP: valore predittivo positivo; EROC: Endometriosis Related Ovarian Cancer

In termini di sensibilità la miglior performance è ottenuta nel discriminare un EROC correlato da un EROC associato mentre la specificità è più elevata nel discriminare un EROC correlato da un non EROC. Complessivamente i livelli di accuratezza diagnostica sono ottimi sia nel discriminare un EROC correlato da un non EROC che un EROC correlato da un EROC associato. Le curve ROC in Figura 15 mostrano la performance diagnostica del CA 19.9 nel distinguere tra EROC correlato, EROC associato e non EROC. In figura 16 viene mostrato il confronto tra le AUC (Area Under the Curve) con il metodo di De Long.

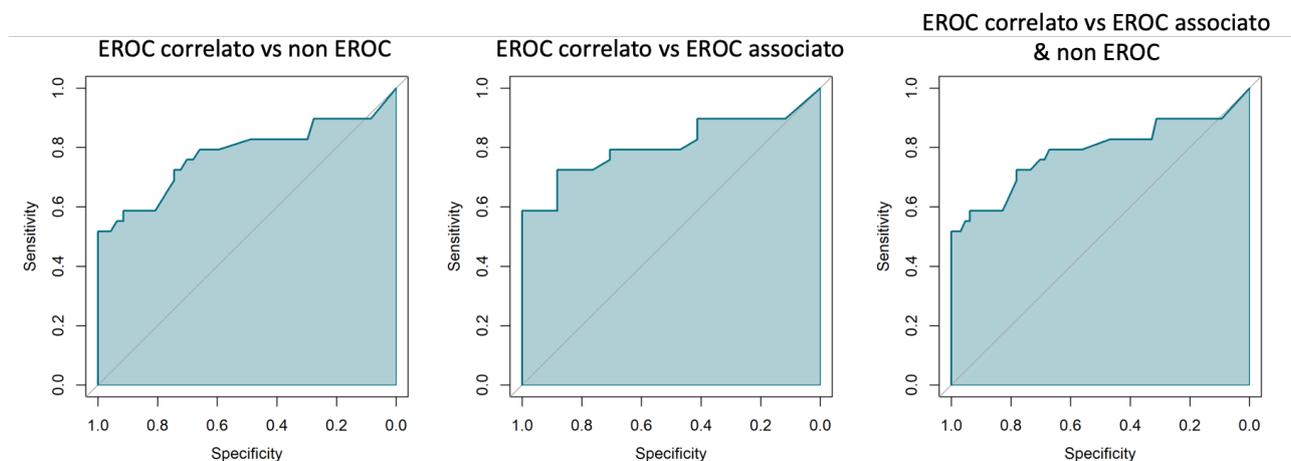


Figura 15. Curva ROC per la performance diagnostica del CA 19.9 nel distinguere tra EROC correlato, EROC associato e non EROC. EROC: Endometriosis Related Ovarian Cancer

5.4 Trattamento, caratteristiche istopatologiche e prognosi

I trattamenti, le caratteristiche istopatologiche e il numero e tipo di recidiva sono riportati nella Tabella 8. Non sono state osservate differenze in termini di tipo di approccio chirurgico, aggressività del gesto chirurgico e complicanze post-operatorie, come indicato dall'Aletti score (che valuta la complessità dell'intervento chirurgico) e dal Dindo score (che valuta le complicanze post-operatorie). Anche per quanto riguarda l'approccio terapeutico, vale a dire la scelta tra chemioterapia neoadiuvante seguita dalla chirurgia di intervallo o la chirurgia citoreducente primaria, non sono emerse differenze. Tuttavia, si osserva una tendenza verso una maggiore frequenza di chirurgia

citoriduttiva primaria nel gruppo di pazienti affette da carcinomi ovarici correlati all'endometriosi. In particolare, nel gruppo di pazienti affette da EROC correlato, solo il 4,2% ha ricevuto un trattamento chemioterapico neoadiuvante, mentre nel gruppo di pazienti con EROC associato, questa percentuale è stata del 17,6%, e nel gruppo dei non EROC, è stata del 21,3%.

La maggioranza delle pazienti in tutti i gruppi analizzati ha ricevuto un trattamento chemioterapico adiuvante. La terapia standard di prima linea per il trattamento dei carcinomi ovarici prevede l'utilizzo concomitante di due farmaci, Carboplatino e Paclitaxel. Questa associazione è stata somministrata più frequentemente nei non EROC, con una percentuale del 78,7%. Nel gruppo dei carcinomi ovarici EROC associati, la percentuale è stata del 58,8%, mentre negli EROC correlati del 50%. In queste pazienti, è stato utilizzato un regime terapeutico alternativo basato esclusivamente su Carboplatino. Nello specifico, nel gruppo dei carcinomi ovarici associati all'endometriosi, la percentuale è stata dell'11,8%, mentre nel gruppo dei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi, è stata del 8,3%. Nelle pazienti con carcinomi EROC correlati, invece, è emerso che nel 37,5% dei casi non è stata somministrata alcuna terapia.

Tabella 8. Trattamento chirurgico e chemioterapico dei carcinomi ovarici non EROC, EROC associato, EROC correlato.

	Non EROC (n=48)	EROC associato (n=17)	EROC correlato (n=29)	Totale (n=94)	p-value
Accesso chirurgico (n, %)					0,211
Laparotomia	46 (95,8%)	14 (82,4%)	26 (89,7%)	86 (91,5%)	
Laparoscopia	2 (4,2%)	3 (17,6%)	3 (10,3%)	8 (8,5%)	
Aletti score (n, %)					0,201
Basso (<=3)	11 (22,9%)	3 (17,6%)	3 (10,3%)	17 (18,1%)	
Intermedio (4-7)	26 (54,2%)	9 (52,9%)	23 (79,3%)	58 (61,7%)	
Alto (>=8)	11 (22,9%)	5 (29,4%)	3 (10,3%)	19 (20,2%)	
Dindo score (n, %)					0,556
0	25 (52,1%)	10 (58,8%)	18 (62,1%)	53 (56,4%)	
1	3 (6,3%)	0	1 (3,4%)	4 (4,3%)	
2	14 (29,2%)	6 (35,3%)	5 (17,2%)	25 (26,6%)	
3	4 (8,3%)	1 (5,9%)	5 (17,2%)	10 (10,6%)	
4	2 (4,2%)	0	0	2 (2,1%)	
CHT neoadiuvante (n, %)					0,172
Si	10 (21,3%)	3 (17,6%)	1 (4,2%)	14 (15,9%)	
No	37 (78,7%)	14 (82,4%)	23 (95,8%)	74 (84,1%)	
CHT adiuvante (n, %)					0,126
Si	40 (85,1%)	16 (94,1%)	17 (70,8%)	73 (83%)	
No	7 (14,9%)	1 (5,9%)	7 (29,2%)	15 (17%)	
Tipo di CHT (n, %)					0,015
Nessuna	6 (12,8%)	1 (5,9%)	9 (37,5%)	16 (18,2%)	
Carboplatino+Taxolo	37 (78,7%)	10 (58,8%)	12 (50%)	59 (67%)	
Carboplatino	1 (2,1%)	2 (11,8%)	2 (8,3%)	5 (5,7%)	
Carboplatino+Abraxane	2 (4,3%)	4 (23,5%)	1 (4,2%)	7 (8%)	
PEB	1 (2,1%)	0	0	1 (1,1%)	
Istotipo (n, %)					<0,001
Seroso alto grado	35 (72,9%)	14 (82,4%)	1 (3,4%)	50 (53,2%)	
Mucinoso	4 (8,3%)	1 (5,9%)	0	5 (5,3%)	
Endometrioide	0	0	19 (65,5%)	19 (20,2%)	
Cellule chiare	0	0	4 (13,8%)	4 (4,3%)	
Seroso basso grado	2 (4,2%)	2 (11,8%)	0	4 (4,3%)	
Indifferenziato	2 (4,2%)	0	0	2 (2,1%)	
Simil-mesonefrico	1 (2,1%)	0	5 (17,2%)	6 (6,4%)	

Altro	4 (8,3%)	0	0	4 (4,3%)	
Stadio FIGO (n, %)					<0,001
I	4 (8,3%)	2 (11,8%)	13 (44,8%)	19 (20,2%)	
II	8 (16,7%)	3 (17,6%)	9 (31%)	20 (21,3%)	
III	27 (56,3%)	9 (52,9%)	6 (20,7%)	42 (44,7%)	
IV	9 (18,8%)	3 (17,6%)	1 (3,4%)	13 (13,8%)	
Neoplasia endometriale (n, %)					0,003
43 (89,6%)	14 (82,4%)	15 (51,7%)	72 (76,6%)		
No	2 (4,2%)	0	4 (13,8%)	6 (6,4%)	
Carcinoma infiltrante	3 (6,3%)	3 (17,6%)	10 (34,5%)	16 (17%)	
Iperplasia con atipie/EIN					
Recidiva (n, %)					0.388
Si	8 (18,6%)	1 (5,9%)	3 (11,1%)	12 (13,8%)	
No	35 (81,4%)	16 (94,1%)	24 (88,9%)	75 (86,2%)	
Localizzazione recidiva (n, %)					0.641
Peritoneale	4 (50%)	0	1 (33,3%)	5 (41,7%)	
Linfonodale	1 (12,5%)	0	0	1 (8,3%)	
A distanza	1 (12,5%)	1 (100%)	1 (33,3%)	3 (25%)	
Peritoneale e linfonodale	2 (25%)	0	1 (33,3%)	3 (25%)	
Status ultimo follow-up (n, %)					0.587
39 (81,3%)	16 (94,1%)	24 (88,9%)	79 (85,9%)		
Non evidenza di malattia	8 (16,7%)	1 (5,9%)	2 (7,4%)	11 (12%)	
Viva con malattia	1 (2,1%)	0	1 (3,7%)	2 (2,2%)	
Deceduta					

EROC: Endometriosis Related Ovarian Cancer; n=numero di pazienti; CHT: chemioterapia; PEB: bleomicina, etoposide, platino; FIGO: Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique; EIN: Endometrial Intraepithelial Neoplasia

Gli istotipi a cellule chiare ed endometrioide nella nostra casistica risultano correlati all'endometriosi nella totalità dei casi. L'istotipo simil-mesonefrico, descritto per la prima volta nel 2016 da Mc Farland et al. [100], è risultato correlato all'endometriosi in 5 pazienti su 6 (83% dei casi). L'istotipo sieroso di alto grado è risultato essere maggiormente rappresentato nel gruppo dei carcinomi non EROC (72,9% dei casi) ed EROC associati (82,4% dei casi). Il carcinoma sieroso di basso grado, invece, appare più frequentemente associato ma non correlato all'endometriosi.

Lo stadio di malattia alla diagnosi risulta meno avanzato nelle pazienti affette da carcinoma ovarico correlato all'endometriosi. Nello specifico, il 44,8% delle pazienti affette da EROC correlato riceve la diagnosi in stadio I e il 31% in stadio II. Al contrario, tra le pazienti affette da carcinoma non EROC, solo l'8,3% riceve una diagnosi in stadio I e il 16,7% in stadio II. Percentuali analoghe sono presenti nelle pazienti con carcinomi associati all'endometriosi, infatti solo l'11,8% viene diagnosticato in stadio I e il 17,6% in stadio II.

Un'altra differenza rilevante riguarda la presenza di patologia endometriale, intesa come lesione tumorale o pretumorale. Nel gruppo di pazienti affette da carcinoma ovarico correlato all'endometriosi, 14 (il 48,3%) presentava un carcinoma endometriale sincrono, una neoplasia endometriale in situ (EIN) o un'iperplasia endometriale con atipie. Di queste 9 erano affette da un carcinoma ovarico endometrioide, 2 da un carcinoma ovarico a cellule chiare e 3 da un carcinoma simil mesonefrico. Nel gruppo di pazienti con carcinoma ovarico associato all'endometriosi, EIN o

iperplasia endometriale con atipie sono state riscontrate in 3 casi (17,6% del totale), mentre non sono stati evidenziati casi di carcinoma endometriale infiltrante. Tra le pazienti con carcinoma ovarico non EROC, solo 5 (il 10,5%) presentavano una patologia endometriale associata.

Per quanto riguarda la prognosi non sono emerse differenze significative in termini di recidiva, sito della recidiva e stato al follow-up come riportato nella Tabella 8. Tuttavia, questi dati devono essere interpretati con attenzione dal momento che, trattandosi di uno studio prospettico, il follow-up di queste pazienti è stato molto breve (1-19 mesi). Un maggior numero di eventi è atteso nei primi cinque anni di follow-up, di conseguenza dati conclusivi in termini prognostici saranno disponibili solo in futuro.

5.5 Analisi immunoistochimica e molecolare

Le mutazioni somatiche dei geni BRCA1 e BRCA2 sono state ricercate nel tessuto tumorale delle pazienti di tutti e tre i gruppi inclusi nello studio. La distribuzione delle mutazioni nei tre gruppi di studio è riportata nella Figura 16. Nel gruppo di pazienti affette da carcinomi ovarici associati all'endometriosi, 7 pazienti (41,2% dei casi) erano BRCA wild type. La percentuale di pazienti BRCA wild type è risultata significativamente più elevata nel gruppo di carcinomi non EROC, con il 68,8% dei casi, e nei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi, con il 65,5% dei casi ($p 0,028$).

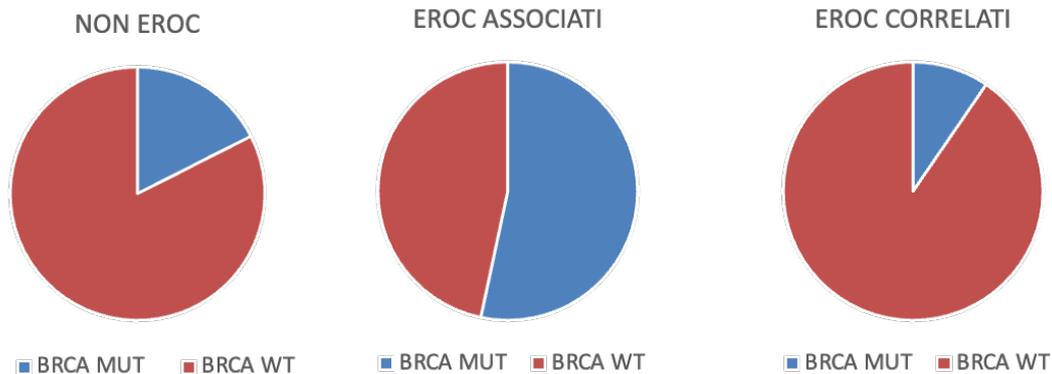


Figura 16. Distribuzione delle mutazioni somatiche dei geni BRCA1 e BRCA2 nei tre gruppi di studio. EROC: Endometriosis Related Ovarian Cancer; BRCA: BREast CAncer gene; MUT: mutazione patogena; WT: wild type.

Il test HRD (Homologous Recombination Deficiency) è un test molecolare utilizzato per valutare la capacità delle cellule tumorali di riparare il danno al DNA attraverso il processo della ricombinazione omologa. La valutazione dello stato di HRD risulta fondamentale nella scelta della terapia di mantenimento nelle pazienti con carcinomi ovarici in stadio avanzato. La distribuzione dello stato di HRD nei tre gruppi di studio è riportata nella Figura 17. Il numero di pazienti che non ha eseguito il test HRD è stato più elevato nelle pazienti affette da carcinoma ovarico correlato all'endometriosi (72,4% dei casi) rispetto alle pazienti con carcinoma associato all'endometriosi (37,5% dei casi) o non EROC (38,3% dei casi). L'incidenza maggiore di test HRD positivo è stata riscontrata nelle pazienti affette da carcinomi ovarici associati all'endometriosi come atteso, con il 50% delle pazienti

testate risultate HRD positive, rispetto alle pazienti con carcinoma ovarico non EROC, in cui il 29,8% dei casi è risultato positiva a HRD, e alle pazienti con carcinoma ovarico correlato all'endometriosi, in cui solo il 10,3% dei casi è risultato positivo al test HRD (p 0,008).

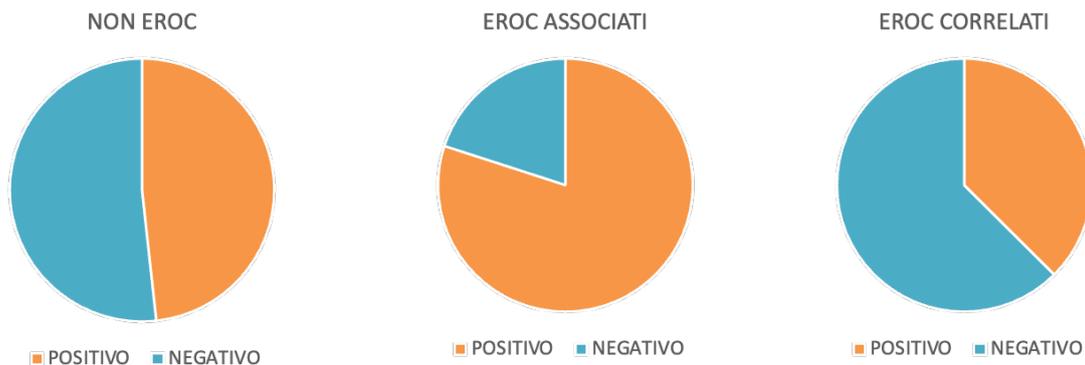


Figura 17. Distribuzione dello stato HRD nei gruppi di studio. EROC: Endometriosis Related Ovarian Cancer

Il gene p53 è un gene oncosoppressore, pertanto le mutazioni che determinano l'inattivazione di questo gene possono contribuire allo sviluppo tumorale. Lo stato mutazionale del gene p53 nella nostra casistica è riportato nella Figura 18. Nei carcinomi ovarici EROC correlati p53 risulta inattivato solo nel 10,3% dei casi mentre nei carcinomi non EROC nel 83,8% dei casi e nei carcinomi EROC associati nel 86,7% dei casi (p 0,001).

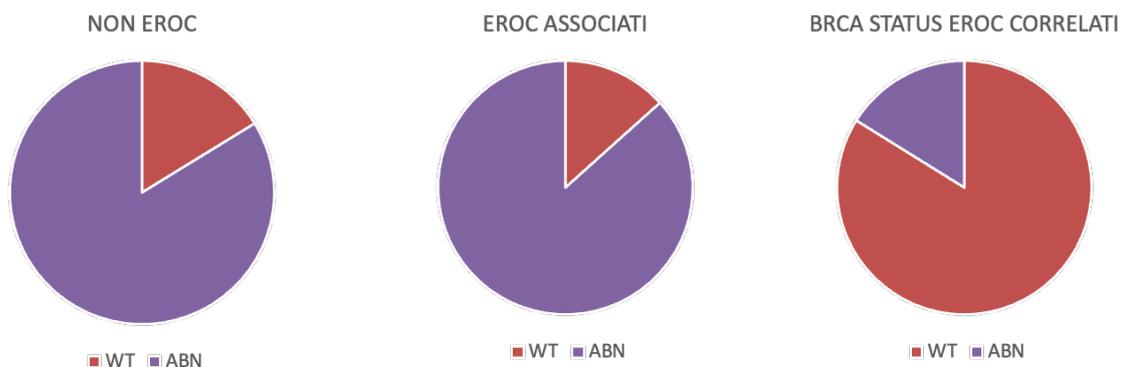


Figura 18. Distribuzione dello stato mutazionale di p53 nei gruppi di studio. EROC: Endometriosis Related Ovarian Cancer; WT: wild-type; ABN: abnormal

Nei carcinomi dell'endometrio la nuova classificazione molecolare introdotta dal TCGA ha suddiviso i tumori in quattro categorie con differente prognosi e specifiche indicazioni terapeutiche: carcinomi POLE-mutati (POLEmut), MMR-deficient (MMRd), con difetti nell'espressione di p53 (p53abn) e nessun profilo molecolare specifico (NSMP) [54]. Analogamente alcuni autori hanno applicato la medesima classificazione ai tumori ovarici correlati all'endometriosi [57,58]. Abbiamo quindi effettuato un'analisi immunohistochimica sul tessuto tumorale conservato per l'esame istologico, un'analisi NGS del DNA estratto dal tessuto e applicato la classificazione molecolare introdotta dal TCGA alla nostra casistica di carcinomi ovarici correlati all'endometriosi.

Dall'analisi NGS in 6 casi non sono state rilevate mutazioni (wild type), in 4 casi è stata riscontrata una mutazione nel gene ARID1A, in 3 casi sono state rilevate mutazioni di CTNNB1, in 3 casi sono state rilevate mutazioni del gene p53, in 3 casi sono state rilevate mutazioni nei geni NRAS/KRAS. Infine, un caso presentava mutazioni nei geni ARID1A e NRAS/KRAS, un caso nei geni ARID1A e CTNNB1, un caso nei geni ARID1A, POLE e NRAS/KRAS, un caso nei geni ARID1A, CTNNB1 e POLE e un caso nei geni ARID1A, POLE e PIK3CA. Nei restanti cinque casi al momento dell'analisi dei dati l'analisi NGS risultava ancora in corso. Come evidenziato nella Figura 19 il gene che risulta più frequentemente mutato nella nostra casistica di EROC correlati è ARID1A seguito da CTNNB1 e NRAS/KRAS. Meno frequenti sono risultate le mutazioni a carico di POLE, p53 e PIK3CA.

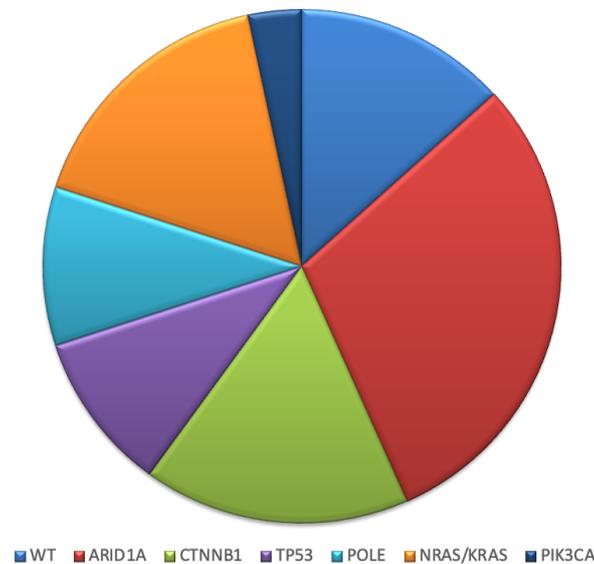


Figura 19. Distribuzione delle mutazioni ritrovate nei tumori nei carcinomi EROC correlati analizzati tramite la tecnica NGS

Applicando la classificazione molecolare introdotta dal TCGA alla nostra casistica, 15 casi appartenevano al gruppo NSMP, 3 casi al gruppo p53 abn, 3 casi al gruppo MMRd e 3 casi al gruppo POLEmut come mostrato graficamente nella Figura 20. Cinque casi non sono stati classificati perché al momento dell'analisi dei dati l'analisi NGS risultava ancora in corso.

Tra i tumori classificati come MMRd in due casi in cui all'immunohistochimica era presente una perdita di espressione di MSH2 e MSH 6 ed è stata confermata la presenza di sindrome di Lynch nelle successive analisi genetiche, mentre in un caso in cui era stata evidenziata una perdita di espressione di MLH1 e PMS2 è stata riscontrata la metilazione del promotore di MLH1.

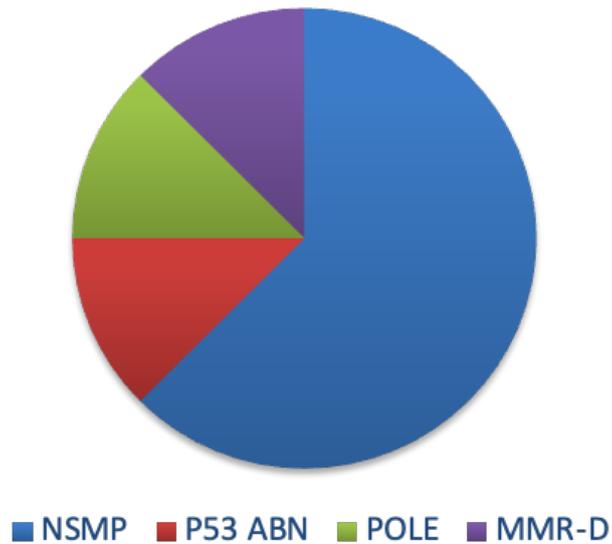


Figura 20. Sottogruppi molecolari TCGA nelle pazienti con carcinomi EROC correlati. p53abn: p53-abnormal; MMR-D: mismatch repair protein expression deficient; POLE: exonuclease domain hotspot mutation; NSMP: no specific molecular profile

Il profilo immunohistochimico dei carcinomi EROC correlati è mostrato in Figura 21.

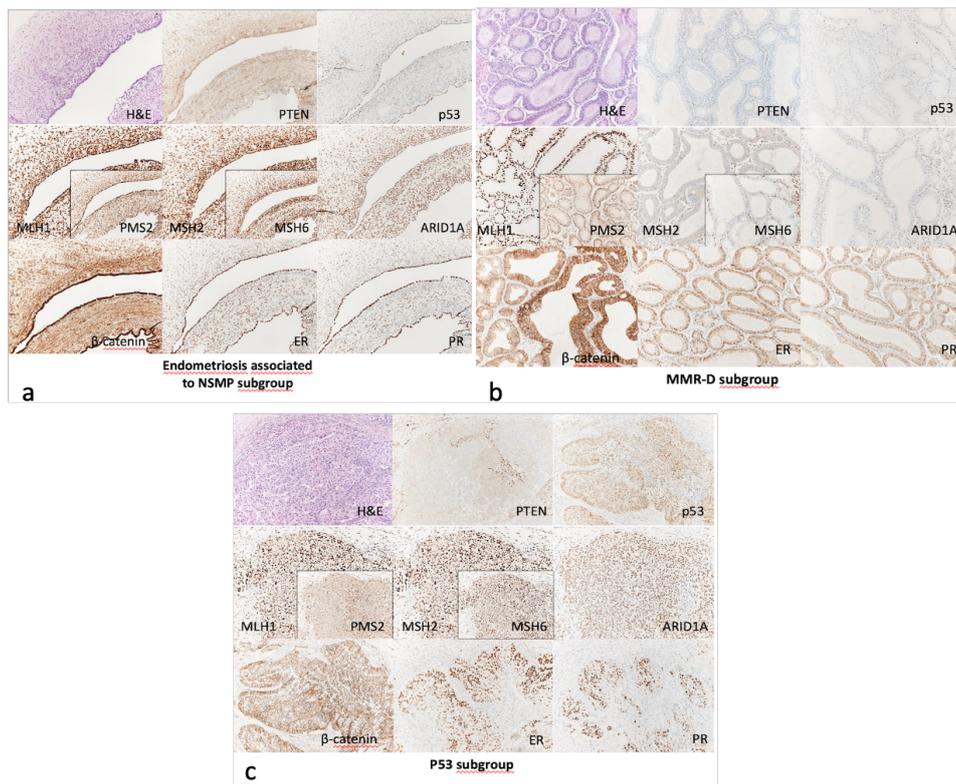


Figura 21. Profilo immunohistochimico rappresentativo di carcinomi appartenenti al gruppo NSMP (a), MMR-D (b), p53 abnormal (c)

5.6 Analisi dell'espressione dei miRNA

Nell'ambito di questo studio è stato avviato un progetto pilota sull'analisi dei miRNA nel contesto tessuto tumorale dei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi. È stata pertanto eseguita tale analisi

sul tessuto tumorale delle prime 14 pazienti affette da EROC correlato arruolate in questo studio. In 9 pazienti è stata effettuata un'analisi sull'endometriosi coesistente e in 4 sull'endometriosi atipica. L'analisi al bioanalyzer, effettuata prima di caricare i campioni in flowcell, ha mostrato che i profili delle library di cDNA erano consistenti e di ottima qualità (Figura 22). La grandezza del frammento è risultata comparabile con la dimensione attesa di circa 180-185 bp.

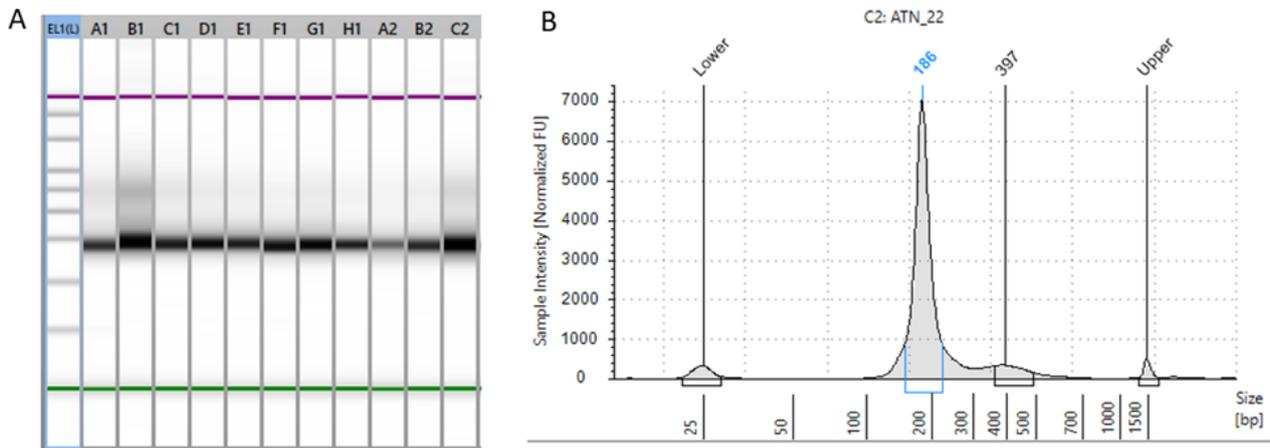


Figura 22. Esempio di cDNA analizzato al Bioanalyzer. A) La banda nera rappresenta la grandezza del frammento di ogni campione. B) Elettroferogramma di un campione; il picco più alto ha una grandezza di circa 186bp come previsto per le libraries di miRNA.

L'analisi di Principal Component come mostrato in figura 23 ha rilevato che la varianza dei profili di espressione dei miRNA nei gruppi analizzati è attribuita in una proporzione di 29.9% dalla componente 1 (Principal Component 1) e di 11.2% dalla componente 2 (Principal Component 2).

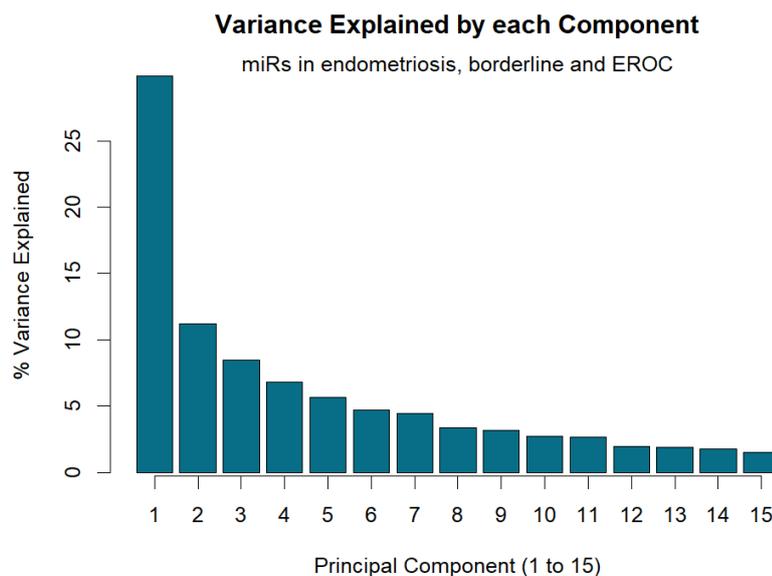


Figura 23. Analisi di Principal Component per la varianza dei profili di espressione dei miRNA. EROC: Endometriosis Related Ovarian Cancer

Andando a graficare queste prime due componenti possiamo osservare un raggruppamento dei 14 campioni di tessuto tumorale (carcinoma ovarico correlato all'endometriosi) e dei 9 campioni di endometriosi (tessuto non tumorale) in due cluster (Figura 24). I 4 campioni borderline, rappresentati dall'endometriosi atipica, invece si trovano al confine di questi due cluster.

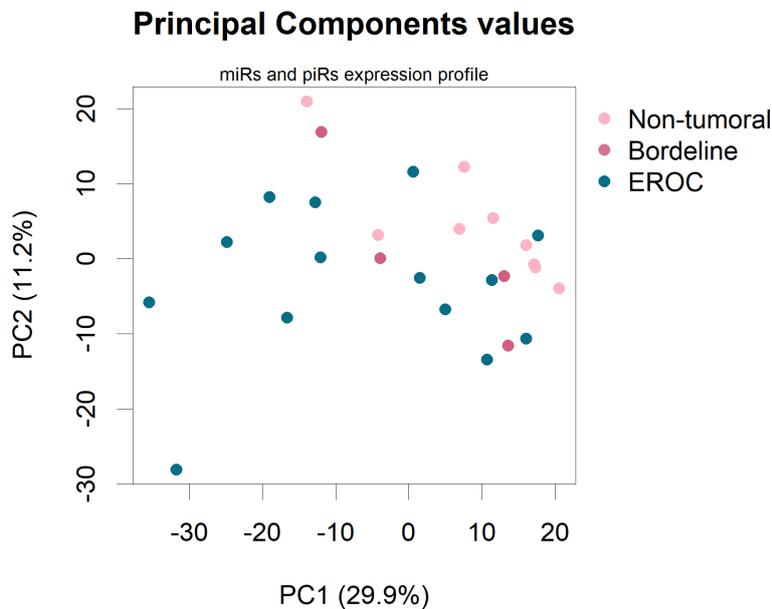


Figura 24. Analisi di Principal Component che mostra come EROC e endometriosi si raggruppino in due cluster. EROC: Endometriosis Related Ovarian Cancer; PC: principal component

Per indagare i miRNA diversamente espressi tra i due gruppi (EROC versus endometriosi) abbiamo condotto un'analisi usando DESeq2 ponendo come gruppo di riferimento quello dei campioni non tumorali (endometriosi). I campioni borderline, rappresentati dall'endometriosi atipica, non sono stati considerati perché presenti in scarsa quantità. Da questa analisi sono stati rilevati un totale di 826 miRNA. Di questi, 276 sono risultati diversamente espressi tra i due gruppi (gruppo EROC versus gruppo endometriosi) come evidenziato in Figura 25.

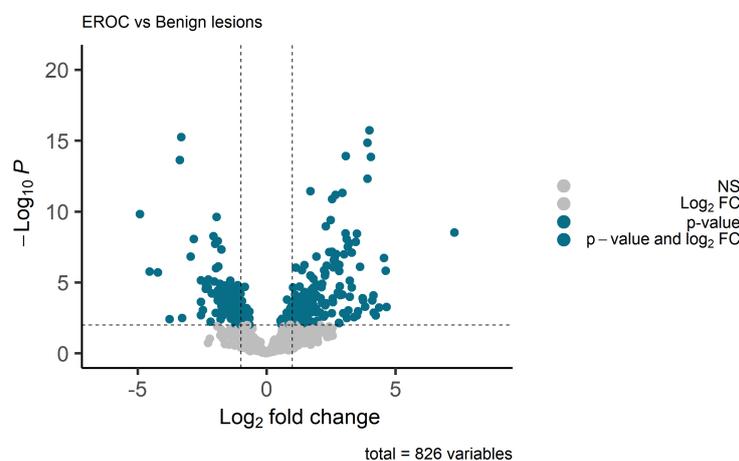


Figura 25. MiRNA diversamente espressi nei carcinomi EROC correlati rispetto all'endometriosi. NS: not significant; FC: fold change

Da questi 276 miRNA, 129 sono risultati upregolati nel gruppo EROC mentre 147 erano erano downregolati. Nella tabella 9 sono mostrati i venti miRNA upregolati in maniera più significativa nel tessuto tumorale (carcinoma ovarico correlato all'endometriosi) rispetto al tessuto non tumorale (endometriosi).

Tabella 9. 20 miRNA upregolati nel tessuto tumorale rispetto al tessuto non tumorale

miRNA	log2FoldChange	P adj
hsa-miR-203b-3p	7.290096	1.54E-07
hsa-miR-182-3p	4.623122	2.51E-05
hsa-miR-183-3p	4.564453	4.31E-06
hsa-miR-96-5p	3.999364	1.56E-13
hsa-miR-182-5p	3.92387	3.90E-13
hsa-miR-183-5p	3.919001	5.72E-11
hsa-miR-449a	3.827125	0.002605
hsa-miR-184	3.751522	0.001185
hsa-miR-3616-3p	3.729003	0.000963
hsa-miR-449b-5p	3.550547	0.004513
hsa-miR-449c-5p	3.509339	0.00733
hsa-miR-1246	3.464993	4.88E-07
hsa-miR-375	3.311893	0.000248
hsa-miR-577	3.22741	0.000791
hsa-miR-885-5p	3.123683	0.010655
hsa-miR-141-3p	3.078358	2.34E-12
hsa-miR-9-5p	3.072342	1.67E-07
hsa-miR-9-3p	3.014087	2.69E-06
hsa-miR-4484	2.974182	0.005492
hsa-miR-141-5p	2.946288	4.53E-10

UTR: untranslated region; miRNA: micro-RNA; P adj: p-value adjusted (Benjamini-Hochberg)

Nella tabella 10 sono mostrati i venti miRNA downregolati in maniera più significativa nel tessuto tumorale rispetto al tessuto non tumorale.

Tabella 10. 20 miRNA downregolati nel tessuto tumorale rispetto al tessuto non tumorale.

miRNA	log2FoldChange	P adj
hsa-miR-133b	-4.91208	1.04E-08
hsa-miR-133a-5p	-4.54006	2.82E-05
hsa-miR-129-2-3p	-4.21766	3.22E-05
hsa-miR-548ba	-3.76433	0.01188
hsa-miR-1-3p	-3.36498	3.19E-12
hsa-miR-133a-3p	-3.30951	2.32E-13
hsa-miR-1247-3p	-3.28113	0.010598
hsa-miR-503-3p	-2.94387	3.67E-06

hsa-miR-424-3p	-2.82682	3.48E-07
hsa-miR-129-5p	-2.54947	0.00145
hsa-miR-144-5p	-2.54538	0.000103
hsa-miR-3943	-2.54348	0.007291
hsa-miR-196a-5p	-2.46276	0.003876
hsa-miR-1247-5p	-2.3629	0.000303
hsa-miR-450a-2-3p	-2.34793	0.000193
hsa-miR-214-3p	-2.27869	0.000248
hsa-miR-424-5p	-2.26297	9.1E-05
hsa-miR-3117-3p	-2.17155	0.016517
hsa-miR-451a	-2.12381	0.000518
hsa-miR-145-5p	-2.06095	2.4E-07

UTR: untranslated region; miRNA: micro-RNA; P adj: p-value adjusted (Benjamini-Hochberg)

Avendo riscontrato un significativo incremento del marcatore tumorale CA 19,9 nelle pazienti con carcinomi ovarici correlati all'endometriosi, abbiamo valutato se tra i miRNA differenzialmente espressi ve ne fossero alcuni coinvolti nella regolazione di questo marcatore. Per questa analisi abbiamo consultato il database present in TargetScan [101] che ci ha permesso di trovare 545 miRNA sia con siti di legame conservati che con siti meno conservati. Successivamente, abbiamo incrociato questo elenco di miRNA con quelli risultati significativi nella nostra analisi, identificando un totale di 42 miRNA riportati nella Tabella 11. Tra questi nove presentavano siti di legame altamente conservati.

Tabella 11. MiRNA coinvolti nella regolazione del gene del CA19.9 in ordine decrescente per conservazione dei siti di legame.

miRNA	Position in the UTR	log2FoldChange	P adj
hsa-miR-3616-3p	655-661	3.729003	0.000963
hsa-miR-3616-3p	896-902	3.729003	0.000963
hsa-miR-4484	932-938	2.974182	0.005492
hsa-miR-20b-5p	1060-1067	2.583504	0.001485
hsa-miR-135b-3p	646-653	2.567358	0.000996
hsa-miR-10a-5p	250-256	2.437261	2.11E-06
hsa-miR-885-3p	854-860	2.291304	0.046406
hsa-miR-93-5p	1060-1067	1.472433	1.25E-05
hsa-miR-330-5p	470-476	1.455186	0.002071
hsa-miR-330-5p	517-523	1.455186	0.002071
hsa-miR-106a-5p	1060-1067	1.449895	0.000954
hsa-miR-106b-5p	1060-1067	1.374291	2.43E-05
hsa-miR-4449	814-820	1.324485	0.004911
hsa-miR-338-3p	94-100	1.30139	0.022062
hsa-miR-338-3p	704-710	1.30139	0.022062
hsa-miR-17-5p	1060-1067	1.282154	0.000227
hsa-miR-3679-5p	136-142	1.178712	0.040593
hsa-miR-25-5p	46-52	1.129369	0.004911

hsa-miR-130b-5p	427-434	1.124403	0.042754
hsa-miR-30c-2-3p	104-110	1.064665	0.006037
hsa-miR-20a-5p	1060-1067	1.054657	0.004602
hsa-miR-19b-3p	1189-1195	1.031563	0.012616
hsa-miR-19a-3p	1189-1195	0.995618	0.024933
hsa-miR-4286	507-513	0.816183	0.006466
hsa-miR-4286	1083-1089	0.816183	0.006466
hsa-miR-106b-3p	616-622	0.79593	0.001108
hsa-let-7i-3p	774-781	-0.65924	0.004535
hsa-miR-22-3p	1178-1184	-0.7842	0.012913
hsa-miR-199b-5p	1193-1199	-0.91499	0.022776
hsa-miR-485-5p	42-48	-1.02717	0.024933
hsa-miR-4324	20-26	-1.04143	0.048694
hsa-miR-212-5p	381-387	-1.04266	0.010456
hsa-miR-329-3p	1088-1094	-1.12882	0.010655
hsa-miR-125b-5p	177-183	-1.25539	0.004033
hsa-miR-150-5p	185-191	-1.37835	0.011281
hsa-miR-486-5p	1250-1257	-1.4838	0.003321
hsa-miR-199a-5p	1193-1199	-1.53303	0.002784
hsa-let-7c-3p	1248-1254	-1.66364	0.003202
hsa-miR-329-5p	820-826	-1.66643	0.00033
hsa-miR-204-3p	516-522	-1.77253	0.041941
hsa-miR-3943	966-972	-2.54348	0.007291
hsa-miR-129-2-3p	1126-1132	-4.21766	3.22E-05

UTR: untranslated region; miRNA: micro-RNA; P adj: p-value adjusted (Benjamini-Hochberg)

Al fine di comprendere la funzione dei miRNA che sono risultati differenzialmente espressi, è stata condotta un'analisi utilizzando lo strumento MiEAA (MicroRNA Enrichment Analysis and Annotation) per identificare i pathway di Gene Ontology coinvolti [94,95]. I pathway più significativi emersi da questa analisi sono stati rappresentati nelle Figure 26 e 27. Nel complesso, è evidente un notevole arricchimento dei percorsi associati a diverse funzioni biologiche. Questi includono i pathway correlati alla segnalazione immunitaria, alla migrazione e alla proliferazione cellulare, alla risposta ai farmaci, alla risposta allo stress ossidativo, all'ipossia e alla risposta agli estrogeni. Nella Figura 27, vengono evidenziati i pathways che condividono un maggior numero di miRNA. È possibile notare che ben 36 miRNA hanno ruoli multipli e sono coinvolti in 10 pathways differenti, suggerendo un'interconnessione complessa tra questi miRNA e le diverse funzioni biologiche sottostanti.

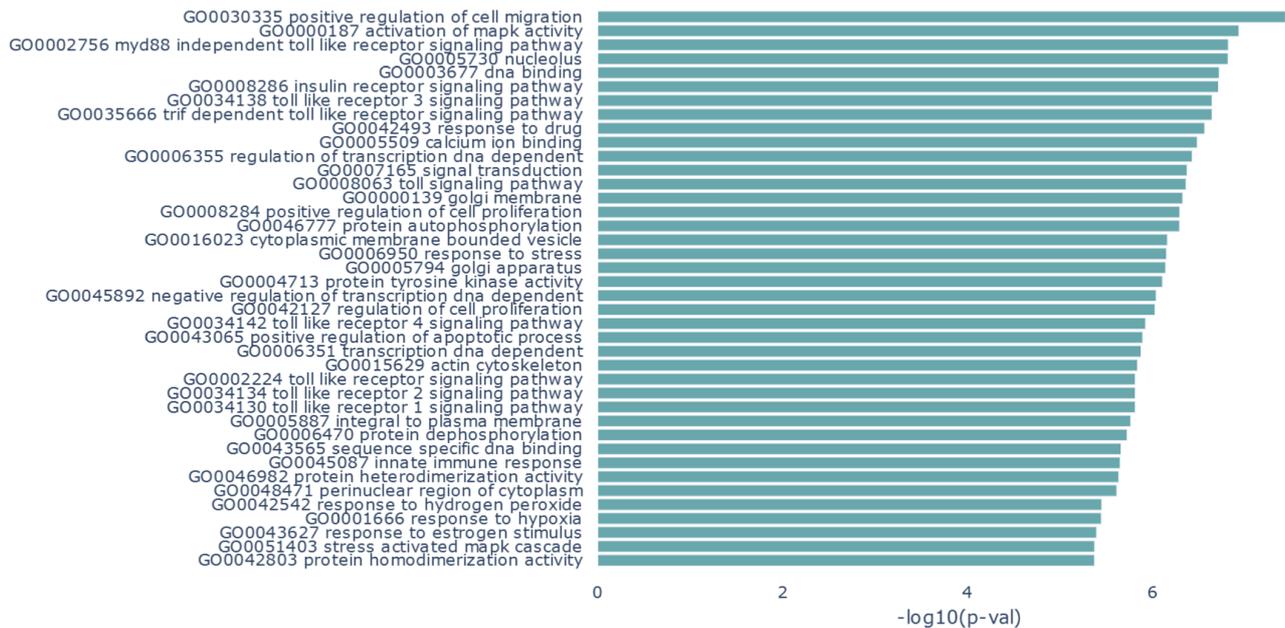


Figura 26. Pathway di Gene Ontology coinvolti emersi dall'analisi dei miNA differenzialmente espressi con MiEEA

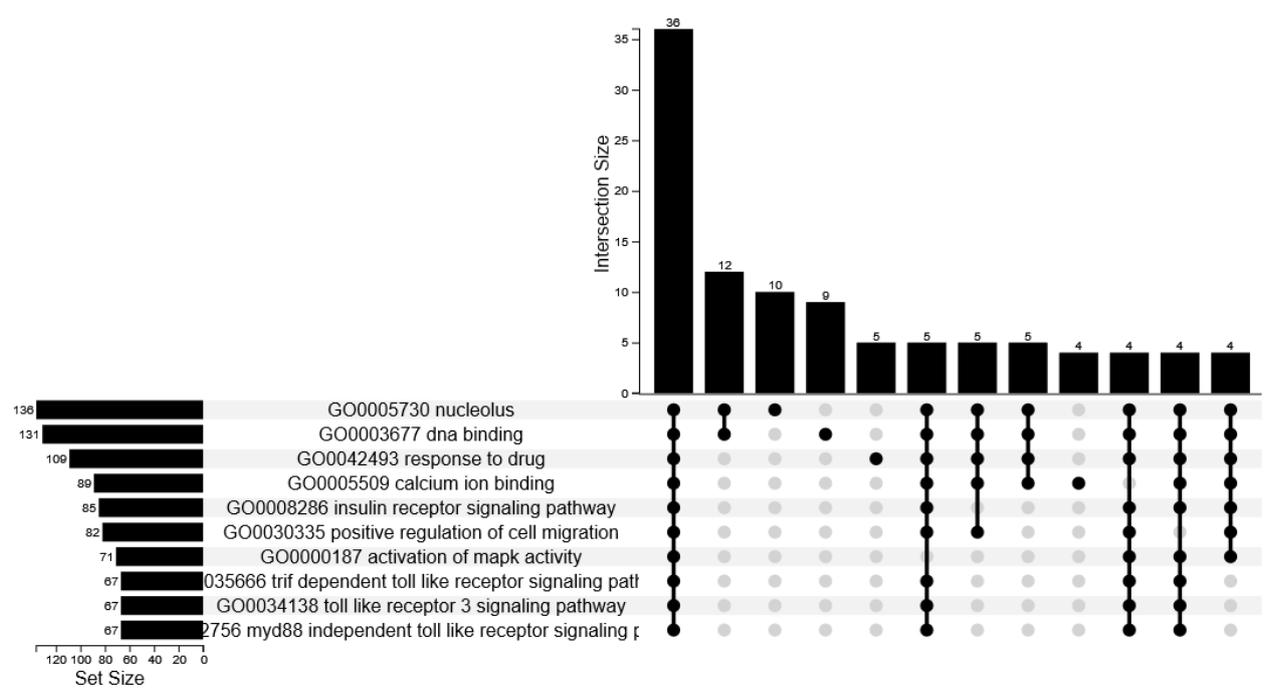


Figura 27. Pathway di Gene Ontology che condividono un maggior numero di miRNA

6. DISCUSSIONE

6.1 Il carcinoma ovarico correlato all'endometriosi: un problema di definizione

Da questo studio emerge una correlazione significativa tra i tumori ovarici e l'endometriosi, con una percentuale che raggiunge il 49% dei casi quando vengono applicati i criteri di Sampson, comunemente utilizzati in letteratura per identificare i cosiddetti Endometriosis Related Ovarian Cancer (EROC). Secondo questi criteri, un tumore ovarico è correlato all'endometriosi quando carcinoma ovarico ed endometriosi coesistono nello stesso ovaio, nell'ovaio controlaterale o nella pelvi. Nel 1953, Scott ha introdotto un quarto criterio, che richiede la dimostrazione di una transizione istologica da endometriosi a carcinoma. Applicando solo questo criterio, il 31% dei carcinomi ovarici inclusi nel nostro studio può essere classificato come correlato all'endometriosi. Nel rimanente 18% dei casi, sebbene endometriosi e carcinoma ovarico coesistano, appaiono come due entità distinte e prive di una diretta correlazione. Nel nostro studio abbiamo quindi suddiviso i carcinomi ovarici in tre gruppi: i non correlati e non associati all'endometriosi (non EROC), che non soddisfano né i criteri di Sampson né quello di Scott; quelli associati all'endometriosi (EROC associati), che soddisfano i criteri di Sampson ma non il criterio di Scott; e quelli correlati all'endometriosi (EROC correlati), che soddisfano i criteri di Sampson e anche il criterio di Scott. Abbiamo inoltre effettuato analisi per verificare se effettivamente esistessero differenze che giustificavano l'utilizzo di questa classificazione e abbiamo riscontrato numerose differenze cliniche e istopatologiche tra questi gruppi. Il gruppo dei tumori associati all'endometriosi mostra talvolta somiglianze con i tumori correlati all'endometriosi e talvolta analogie con i tumori non correlati e non associati all'endometriosi.

6.2 L'età alla diagnosi nelle pazienti affette da EROC correlato

I tumori ovarici correlati e associati all'endometriosi insorgono a un'età mediamente più giovane rispetto ai carcinomi non correlati all'endometriosi (57 anni e 61 anni rispettivamente, rispetto a 65 anni). In questo studio è stato rilevato un numero più elevato di pazienti in premenopausa nel gruppo affetto da carcinomi ovarici correlati all'endometriosi (34,5% dei casi) rispetto al gruppo dei carcinomi ovarici non EROC (14,6% dei casi), sebbene questo dato rappresenti solo una tendenza e non raggiunga la significatività statistica.

Questo è un aspetto di notevole rilevanza nel contesto del follow-up e del management delle pazienti affette da endometriosi, poiché il rischio di sviluppare un tumore sembra essere più elevato nel periodo post-menopausale, ma sembrerebbe presente anche nel periodo peri e premenopausale. Questo solleva la questione se possa essere utile un aumento della sorveglianza, come ad esempio l'adozione di controlli ecografici semestrali e il monitoraggio dei marcatori tumorali nel periodo menopausale o perimenopausale, al fine di poter ottenere una diagnosi precoce.

Il management degli endometriomi asintomatici nelle donne che si avvicinano alla menopausa è allo stato attuale oggetto di dibattito. Non è chiaro se tali lesioni si risolvano completamente dopo la menopausa o se possano ridursi fino a non essere più rilevabili ecograficamente pur rimanendo presenti microscopicamente, con un rischio basso ma non trascurabile di trasformazione neoplastica. Alcuni autori sollevano il quesito se debba essere proposto un intervento chirurgico di riduzione del rischio e, in caso affermativo, con che tempistica (perimenopausa o attesa fino a dopo la menopausa) [37]. Uno studio condotto da Melin et al. ha riscontrato una riduzione del rischio di carcinoma ovarico nelle pazienti con endometrioma sottoposte a chirurgia con asportazione radicale di tutta l'endometriosi visibile [102].

6.3 Progressiva diagnosi di endometriosi e storia di infertilità

Un dato sorprendente emerso dal nostro studio è la bassa percentuale di pazienti affette da tumori ovarici correlati all'endometriosi che avevano precedentemente ricevuto una diagnosi di endometriosi, solo il 21% dei casi. Questa percentuale è ancora più bassa nelle pazienti con tumori ovarici associati all'endometriosi, dove la diagnosi di endometriosi era stata posta solo nel 6% dei casi. Questo risultato potrebbe essere attribuibile alla scarsa diffusione dell'ecografia come esame di routine nelle decadi precedenti, che potrebbe aver determinato che una minor quantità di pazienti ricevesse una diagnosi di endometriosi. La prevalenza dell'endometriosi nella popolazione generale è incerta in quanto la diagnosi definitiva richiederebbe la conferma istologica. Tuttavia, varia dal 2% all'11% tra le donne asintomatiche, dal 5% al 50% tra le donne infertili e dal 5% al 21% tra le donne ospedalizzate per dolore pelvico [2]. Le donne asintomatiche o con sintomi lievi potrebbero non essere state sottoposte a controlli ecografici e, nel periodo post-menopausale, l'endometriosi potrebbe essersi ridotta al punto da non essere più rilevabile ecograficamente, come suggerito da Anglesio et al. [37]. Nel nostro studio, il 38% delle pazienti affette da EROC correlato erano nullipare, mentre nei restanti due gruppi questa percentuale si attestava al 23%. Questa osservazione potrebbe essere correlata a uno stadio più avanzato dell'endometriosi nei carcinomi correlati all'endometriosi rispetto a quelli associati, nei quali la diagnosi di endometriosi è stata incidentale nel 94% dei casi. Tuttavia, è importante sottolineare che l'infertilità legata all'endometriosi rappresenta un fenomeno estremamente complesso che coinvolge una serie di fattori come l'infiammazione, le alterazioni dell'anatomia pelvica, la formazione di aderenze e una ridotta riserva ovarica. La popolazione di donne infertili affette da endometriosi è estremamente eterogenea, il che rende difficile stabilire un unico meccanismo di infertilità correlato all'endometriosi [103].

6.4 Familiarità neoplastica: il ruolo della genetica

Per quanto riguarda la familiarità neoplastica, abbiamo osservato che nel gruppo di carcinomi non EROC era più frequente una storia familiare di carcinoma della mammella, mentre tra le pazienti con

EROC associato, l'anamnesi familiare era più spesso positiva per carcinoma dell'endometrio e del colon. Un'ipotesi è che questo possa essere legato a una maggior incidenza di mutazioni germinali nei geni BRCA1 e BRCA2 nei carcinomi non EROC e di Sindrome di Lynch con instabilità microsatellitare nei casi di EROC associato.

Tuttavia, nella nostra casistica, questa ipotesi non è stata confermata. Le mutazioni somatiche o germinali nei geni BRCA1 e BRCA2 erano presenti nel 53% delle pazienti affette da EROC associato, ma solo nel 18% delle pazienti affette da carcinoma non EROC e nel 10% dei casi di carcinoma EROC correlato. Per quanto riguarda le mutazioni nei geni del mis-match repair, non è possibile fare un confronto tra i gruppi poiché l'analisi immunohistochimica per verificare la perdita di espressione di MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6 è stata eseguita solo nel gruppo dei carcinomi EROC correlati. È interessante notare che in letteratura non sono state riportate informazioni sull'incidenza di endometriosi nelle pazienti portatrici di mutazioni BRCA o affette da sindrome di Lynch. Pertanto, in futuro sarebbe utile condurre uno studio che verifichi l'effettiva incidenza di endometriosi nelle pazienti BRCA mutate attraverso una revisione dei preparati istologici ottenuti dalla chirurgia di riduzione del rischio.

6.5 L'ecografia ginecologica: il ruolo centrale dell'operatore esperto

Il ruolo dell'esame ecografico è centrale sia nel follow-up delle pazienti affette da endometriosi sia nello studio delle tumefazioni annessiali [11,15]. Il rischio di carcinoma ovarico risulta più elevato nelle pazienti nullipare, con un'età avanzata alla diagnosi di endometriosi (≥ 45 anni), con cisti ovarica ≥ 9 cm di diametro medio e con presenza di componenti solide [104]. Per quanto riguarda l'aspetto ecografico delle tumefazioni annessiali non è stato possibile rilevare delle differenze significative tra i gruppi nonostante in letteratura siano riportati aspetti peculiari tra i differenti istotipi [76,77]. La maggior parte delle masse annessiali presenti nei tre gruppi analizzati erano, come atteso, tumefazioni multiloculari solide o solide, di circa 9 cm di diametro medio, dotate di discreta o intensa vascolarizzazione al PD (CS 3 o 4). Nonostante questo aspetto sostanzialmente sovrapponibile delle tumefazioni annessiali, il modello ADNEX, sviluppato dal gruppo IOTA, ha dimostrato di essere più performante nella valutazione del rischio di malignità dei carcinomi non EROC [75]. In questo studio nell'89% dei casi ha identificato correttamente la lesione come maligna nei carcinomi non EROC, mentre la sua sensibilità è stata del 60% e 79% rispettivamente nei carcinomi EROC associati e correlati. La valutazione soggettiva da parte di un ecografista esperto è stata in grado di classificare correttamente la lesione come maligna nell'89% dei casi di carcinoma non EROC, nel 73% dei casi di EROC associato e nel 90% di EROC correlato. In caso di tumefazioni ovariche in pazienti con endometriosi, sembrerebbe che l'esperienza di un esperto nell'ecografia sia più affidabile dei modelli matematici. Due caratteristiche ecografiche accomunano invece i carcinomi associati e i carcinomi

correlati all'endometriosi: l'unilateralità della tumefazione annessiale e l'assenza di versamento pelvico, quest'ultimo aspetto più frequente negli EROC associati.

Tali caratteristiche non possono essere spiegate dalla semplice differenza nello stadio alla diagnosi poiché lo stadio è più frequentemente iniziale esclusivamente negli EROC correlati e non negli EROC associati. Infatti, il 75% dei carcinomi non EROC e il 72% degli EROC associati sono stati identificati in uno stadio avanzato (stadio FIGO III-IV), mentre la maggior parte dei pazienti con carcinomi correlati all'endometriosi è stata diagnosticata in uno stadio iniziale, con il 76% dei casi individuati nello stadio I-II. Un'ipotesi da verificare nel corso di ulteriori studi è l'eventualità di una maggior diffusione linfonodale nei casi di EROC associati rispetto ai carcinomi non EROC, che potrebbero tendere a presentare una maggiore diffusione all'interno della cavità peritoneale.

6.6 EROC correlato e neoplasie endometriali

Un altro aspetto ecografico peculiare degli EROC correlati che trova un riscontro istopatologico è la presenza di una rima endometriale di spessore maggiore rispetto agli altri due gruppi analizzati. All'esame istologico definitivo il 48% delle pazienti con EROC correlato hanno ricevuto una diagnosi di patologia endometriale neoplastica o preneoplastica (carcinoma dell'endometrio, EIN o iperplasia con atipia). Questo porta a due considerazioni, in primo luogo per le pazienti con sospetto EROC correlato candidate a un trattamento fertility-sparing con conservazione dell'utero sembra ragionevole eseguire una biopsia endometriale, possibilmente nel periodo preoperatorio, per ottenere una conferma istologica dell'assenza di patologia. In secondo luogo, per le pazienti in follow-up per endometriosi, la presenza di perdite ematiche atipiche, il riscontro ecografico di ispessimento endometriale o di endometrio non uniforme dovrebbero essere prontamente indagati nel sospetto di una patologia endometriale. Una recente metanalisi ha rivelato che l'endometriosi comporta un lieve aumento del rischio di sviluppare un carcinoma endometriale (RR, 1,662) [105]. Questo aumento potrebbe essere attribuito a fattori di rischio comuni tra le due condizioni. I dati provenienti dalla nostra casistica suggeriscono che la trasformazione neoplastica dell'endometriosi e del tessuto endometriale avvenga in modalità sincrona secondo meccanismi al momento sconosciuti.

6.7 Istotipi correlati all'endometriosi e ipotesi di trasformazione neoplastica

Per quanto concerne la distribuzione degli istotipi nei tre diversi gruppi i nostri dati confermano quanto precedentemente riportato in letteratura: i carcinomi correlati all'endometriosi, in cui si può identificare una trasformazione da endometriosi a carcinoma, sono principalmente costituiti dagli istotipi a cellule chiare ed endometrioide [41,60]. I carcinomi simil-mesonefrici, un istotipo descritto per la prima volta sette anni fa, sembrano essere strettamente correlati all'endometriosi. L'istotipo sieroso di alto grado è risultato, come previsto, più frequente nel gruppo dei carcinomi non EROC

(72,9% dei casi) ed EROC associati (82,4% dei casi). Il carcinoma sieroso di basso grado risulta più comunemente associato ma non correlato all'endometriosi.

Il meccanismo attraverso il quale l'endometriosi possa favorire la trasformazione neoplastica rimane ancora da chiarire, in particolare per i carcinomi che non sembrano correlati all'endometriosi. Si ritiene che la trasformazione neoplastica di una cisti endometriosica possa essere influenzata dal microambiente all'interno della cisti stessa. In particolare, il fluido contenuto nella cisti presenta una concentrazione significativa di ferro libero che risulta essere coinvolto nello sviluppo di tumori in diversi organi causando uno stress ossidativo [106]. Uno studio condotto da Brunty et al. sottolinea l'importanza del microambiente e dell'infiammazione cronica associata all'endometriosi nella trasformazione neoplastica. Questo studio potrebbe almeno in parte spiegare la trasformazione neoplastica nei tumori in cui non si evidenzia una trasformazione istologica diretta dall'endometriosi al carcinoma, ma solo un'associazione apparentemente casuale con l'endometriosi. L'ipotesi alla base dell'esperimento è che il liquido peritoneale delle pazienti affette da endometriosi possa favorire lo sviluppo del carcinoma ovarico. Il liquido peritoneale è stato prelevato da pazienti con e senza endometriosi nel corso di un intervento chirurgico ed è stato messo in coltura con cellule epiteliali ovariche umane normali e con la linea cellulare TOV-21G, una linea cellulare di carcinoma ovarico umano a cellule chiare. Le cellule TOV-21G trattate con il liquido peritoneale proveniente da donne con endometriosi hanno mostrato un aumento della crescita, accompagnato da una sovra-regolazione di vari geni infiammatori [107].

6.8 Marcatori tumorali: il ruolo chiave del CA 19.9 nella diagnosi e nel follow-up degli EROC

Un ulteriore risultato rilevante emerso da questa tesi riguarda l'analisi dell'espressione dei marcatori tumorali prima dell'inizio del trattamento chirurgico o chemioterapico. Mentre l'espressione del CA 125 non ha mostrato differenze significative risultando mediamente al di sopra dei valori limite in tutti e tre i gruppi, l'espressione del CA 19.9 è risultata notevolmente più elevata nei casi di carcinomi ovarici correlati all'endometriosi. Il CA 19-9 è un pentasaccaride con una componente glucidica appartenente ad un gruppo di antigeni oncofetali. Nel periodo fetale viene sintetizzato nelle strutture epiteliali dello stomaco e in età adulta la sua produzione diminuisce notevolmente. Il CA 19-9 può essere prodotto nelle strutture ghiandolari della colecisti, del pancreas, dei bronchi e di alcuni tumori ginecologici [108]. Alcuni studi hanno evidenziato un rialzo del CA 19.9 nelle pazienti affette da endometriosi [109]. Tuttavia, uno studio condotto da Xu et al. ha evidenziato livelli di CA19-9 più alti (21,44 vs. 4,72 U/mL, $P < 0,001$) nelle pazienti con carcinomi ovarici correlati all'endometriosi rispetto alle pazienti con endometriosi ovarica [110]. In questo studio il dosaggio ematico del CA19-9 combinato con l'HE4 aveva un'elevata sensibilità (72,73%) e specificità (78,41%) nella diagnosi di EROC. Questi risultati sono confermati anche nella nostra casistica in cui il CA 19.9 riesce a

discriminare con una buona accuratezza diagnostica i carcinomi correlati all'endometriosi dagli altri carcinomi ovarici. Un dato molto interessante emerso dal nostro studio è la presenza di 42 miRNA dotati di un ruolo nella regolazione del CA 19.9 che hanno un'espressione differente tra il tessuto tumorale dei carcinomi correlati all'endometriosi e il tessuto non tumorale (endometriosi). Inoltre, di questi nove presentano con siti di legame altamente conservati. Il sito di legame si mantiene altamente conservato quando il ruolo biologico del miRNA risulta di particolare rilevanza.

Questo riscontro conferma l'importanza del CA 19.9 come marcatore per la diagnosi e il follow-up dei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi e apre la strada a nuove ipotesi di ricerca.

6.9 Espressione dei miRNA e pathway up e downregolate negli EROC

Dal nostro studio è emerso che l'espressione dei miRNA nel tessuto neoplastico dei tumori ovarici correlati all'endometriosi differisce rispetto al tessuto non neoplastico, composto da campioni di endometriosi provenienti dalle stesse pazienti affette da EROC correlato. I nostri dati trovano conferma in altri studi che hanno evidenziato una differente espressione dei miRNA nei tessuti neoplastici EROC correlati rispetto ai carcinomi non correlati all'endometriosi [10].

In dettaglio, in letteratura si trovano funzioni più specifiche dei miRNA disregolati negli EROC correlati come riportato sulla piattaforma Gene Cards [111]. Nella Tabella 12 sono mostrate le funzioni biologiche dei miRNA upregolati nel tessuto tumorale. Possiamo notare che buona parte di essi sono legati a pathway che influenzano le funzioni immunitarie, la segnalazione cellulare e la riparazione del DNA.

Tabella 12. Pathways coinvolte nei 20 miRNA più significativamente up regolati negli EROC correlati [111].

miRNA	Ruolo
hsa-miR-203b-3p	Interazione tra cellule immunitarie e miRNA nel microambiente tumorale Ruolo nella risposta immunitaria nella sepsi
hsa-miR-182-3p hsa-miR-182-5p	Regolazione del pathway di p53 nel carcinoma della prostata
hsa-miR-183-3p hsa-miR-183-5p	Ruolo nella pathway di segnalazione del recettore di TGF Beta
hsa-miR-96-5p	Silenziamento genico tramite inibizione della traduzione Regolazione positiva del processo di biosintesi del colesterolo
hsa-miR-449a hsa-miR-449b-5p hsa-miR-449c-5p	MiRNA coinvolti nella risposta al danno al DNA Insufficienza ovarica primaria
hsa-miR-184	Silenziamento genico mediato dai miRNA
hsa-miR-3616-3p	Non noto
hsa-miR-1246	Regolazione positiva dell'attività del fattore di trascrizione NF-kappa Beta Regolazione positiva della via di segnalazione mediata dal fattore di necrosi tumorale
hsa-miR-375	Differenziamento dell'endoderma Regolazione negativa della segnalazione della proteina chinasi B Regolazione negativa dell'angiogenesi Regolazione positiva del processo apoptotico delle cellule endoteliali.
hsa-miR-577	Silenziamento genico mediato dai miRNA
hsa-miR-885-5p	Azione a monte della regolazione negativa dell'espressione genica Azione a monte della regolazione negativa dell'angiogenesi

	Azione a monte della regolazione negativa della migrazione cellulare Azione a monte della regolazione negativa della via di segnalazione BMP
hsa-miR-141-3p	Differenziamento dell'endoderma Target dei miRNA nella matrice extracellulare e nei recettori di membrana
hsa-miR-9-5p hsa-miR-9-3p	Silenziamento genico mediato dai miRNA Differenziazione cellulare
hsa-miR-4484	Associazione con lichen
hsa-miR-141-5p	Differenziamento dell'endoderma Target dei miRNA nella matrice extracellulare e nei recettori di membrana

Hsa-miR: Homo sapiens microRNA

Nella Tabella 13 viene evidenziato il ruolo dei miRNA down regolati nel tessuto tumorale. Anche in questo caso la maggior parte di essi risulta coinvolto in pathway che influenzano la riparazione del DNA, la differenziazione cellulare e la regolazione dell'espressione genica.

Tabella 13. Pathways coinvolte nei 20 miRNA più significativamente down regolati negli EROC correlati [111].

miRNA EROC vs non-tumoral tissue	Ruolo
hsa-miR-133b hsa-miR-133a-5p hsa-miR-133a-3p	Differenziazione cellulare MiRNA coinvolti nell'ipertrofia delle cellule del miocardio MiRNA coinvolti nella differenziazione delle cellule muscolari
hsa-miR-129-2-3p hsa-miR-129-5p	Silenziamento genico mediato dai miRNA
hsa-miR-548b	Regolazione del pathway di p53 nel carcinoma della prostata
hsa-miR-1-3p	Differenziazione cellulare
hsa-miR-1247-3p	Inibizione della proliferazione cellulare
hsa-miR-503-3p	MiRNA coinvolto nella risposta al danno al DNA
hsa-miR-424-3p hsa-miR-424-5p	MiRNA coinvolti nella risposta al danno al DNA
hsa-miR-144-5p	Azione a monte della regolazione negativa del processo di biosintesi delle glicoproteine Azione a monte della regolazione positiva dell'espressione genica Azione a monte della regolazione negativa dell'espressione genica Azione a monte della regolazione negativa della transizione da epitelio a mesenchima Azione a monte della regolazione positiva dell'organizzazione dei mitocondri
hsa-miR-3943	Ruolo nel processo autofagico
hsa-miR-196a-5p	Silenziamento genico mediato dai miRNA
hsa-miR-1247-5p	Oncosoppressore
hsa-miR-450a-2-3p	MiRNA coinvolto nella risposta al danno al DNA
hsa-miR-214-3p	Differenziazione cellulare MiRNA coinvolto nell'ipertrofia delle cellule del miocardio Interazione tra cellule immunitarie e miRNA nel microambiente tumorale MiRNA coinvolto nella differenziazione delle cellule muscolari
hsa-miR-3117-3p	Proteine bersaglio della via di segnalazione Map chinasi
hsa-miR-451a	Regolazione negativa dell'espressione genica e della migrazione cellulare Azione a monte della regolazione negativa dell'attività del trasportatore Silenziamento genico mediato dai miRNA Regolazione positiva della guarigione di lesioni vascolari
hsa-miR-145-5p	Differenziazione cellulare MiRNA coinvolto nella risposta al danno al DNA Sviluppo cardiaco Ruolo nella risposta immunitaria nella sepsi

Hsa-miR: Homo sapiens microRNA

Un dato interessante che emerge dalla analisi dei pathway sono i miRNA coinvolti nei pathway del controllo del sistema immunitario. Questo potrebbe portare a delle implicazioni importanti per l'immunoterapia in questo tipo di cancro [112,113]. Visto il ruolo cruciale dei miRNA nella espressione genica in generale, nel contesto del sistema immunitario, i miRNA possono influenzare l'espressione dei geni coinvolti in processi chiave come l'attivazione delle cellule immunitarie, la risposta infiammatoria e la formazione di risposte immunitarie specifiche contro il cancro.

L'infiammazione svolge un ruolo importante nella risposta immunitaria contro il cancro. I miRNA possono regolare i mediatori infiammatori, come le citochine, che possono influenzare la crescita e la diffusione dei tumori. Alcuni miRNA possono promuovere un ambiente infiammatorio favorevole all'attacco del sistema immunitario contro le cellule tumorali, mentre altri possono avere effetti opposti [114,115]. Nei tumori, è comune che il microambiente tumorale determini un'immunosoppressione, ovvero un ambiente che ostacola la risposta immunitaria contro il cancro. Alcuni miRNA possono contribuire a questa immunosoppressione, inibendo la funzione delle cellule immunitarie o promuovendo la crescita delle cellule tumorali. Comprendere come i miRNA regolano queste interazioni è essenziale per sviluppare strategie di immunoterapia efficaci [116,117].

La ampia deregolazione dei miRNA nei carcinomi correlati all'endometriosi rispetto al tessuto non tumorale (endometriosi) suggerisce di valutare l'opportunità di utilizzare queste molecole come biomarcatori predittivi e/o diagnostici. L'analisi dei profili di espressione dei miRNA nelle pazienti con EROC correlato in futuro potrebbe fornire informazioni utili per la personalizzazione delle strategie terapeutiche. Alcuni miRNA potrebbero essere utilizzati come biomarcatori predittivi per la risposta all'immunoterapia. Identificare quali miRNA sono associati a una risposta positiva o negativa potrebbe svolgere un ruolo cruciale nella selezione delle terapie ottimali per ciascun paziente. La ricerca futura si dovrebbe concentrare sulla caratterizzazione di questi miRNA nei fluidi biologici delle pazienti, quali il sangue, l'urina o la saliva [118]. La validazione di deregolazioni significative dei vari miRNA potrebbe portare all'implementazione di uno strumento diagnostico precoce per identificare la presenza del EROC e prevedere il rischio di recidiva e la prognosi. Di conseguenza, questo capitolo della tesi rappresenta un passo iniziale verso una comprensione più approfondita di tali meccanismi, aprendo la strada all'implementazione di nuove strategie diagnostiche personalizzate per migliorare la gestione della malattia.

6.10 Punti di forza, limiti dello studio e prospettive future

La correlazione tra endometriosi e carcinoma ovarico è nota da tempo, ed è stata descritta per la prima volta da Sampson già nel 1927 [30]. Tuttavia, molti quesiti rimangono ancora irrisolti riguardo il ruolo dell'endometriosi nella carcinogenesi del tumore ovarico.

La nostra casistica conferma quanto già riportato in letteratura riguardo l'elevata incidenza di carcinomi endometrioidi e a cellule chiare nei casi di carcinomi ovarici correlati all'endometriosi, avvalorando l'ipotesi che l'endometriosi atipica possa essere un diretto precursore di questi istotipi [37]. La peculiarità di questo studio rispetto ai precedenti studi pubblicati in letteratura è il confronto tra carcinomi ovarici correlati e associati all'endometriosi e carcinomi che non presentano correlazione né associazione con essa. Gli studi precedenti hanno confrontato i diversi istotipi di carcinomi ovarici correlati all'endometriosi tra loro, senza condurre un confronto con i carcinomi ovarici non correlati all'endometriosi [39–41]. Una novità sostanziale rispetto alla letteratura pubblicata sull'argomento riguarda l'identificazione del gruppo dei carcinomi ovarici associati all'endometriosi, che non presentano una evidenza di una trasformazione istologica da endometriosi a carcinoma ma che coesistono con l'endometriosi come entità distinte.

I punti di forza di questo studio sono la sua natura prospettica, la multidisciplinarietà degli argomenti affrontati e le importanti implicazioni cliniche.

Le principali limitazioni riguardano il basso numero di pazienti arruolate per la rarità della patologia e la sua natura monocentrica.

Le prospettive future riguardano l'applicazione di analisi di radiomica ai carcinomi ovarici EROC correlati, l'arruolamento di un maggior numero di pazienti per ampliare la casistica e la raccolta dei dati di follow-up per verificare differenze nella prognosi tra i gruppi analizzati. Una volta ampliato il numero di pazienti arruolati nello studio, se fossero confermati i risultati di questa tesi, le implicazioni cliniche potrebbero prevedere una sorveglianza periodica clinica ed ecografica delle pazienti affette da endometriosi in peri e post menopausa.

7. CONCLUSIONI

Questa tesi ha rappresentato una grande opportunità per approfondire un argomento ancora poco studiato nella letteratura scientifica: l'endometriosi cancerizzata. Frequentemente l'endometriosi viene considerata una patologia che interessa la donna in età fertile e si pone l'attenzione su aspetti quali il dolore pelvico cronico, la dismenorrea e l'infertilità. Tuttavia, ciò che accade quando una donna entra in menopausa e la sintomatologia dolorosa cessa rappresenta un argomento ancora poco esplorato. Date le attuali tendenze demografiche, che vedono un importante invecchiamento della popolazione nei paesi occidentali, e di conseguenza l'aumento del numero di pazienti con una diagnosi di endometriosi che si avvicinano alla menopausa, è fondamentale raccogliere evidenze per fornire risposte alle domande di queste pazienti. Le domande sono molteplici e spaziano da quale sia il ruolo della chirurgia nelle pazienti con endometriosi in menopausa o peri menopausa, se la sorveglianza ambulatoriale rappresenti una valida alternativa alla chirurgia e quali siano le modalità e le tempistiche con cui tale sorveglianza dovrebbe essere condotta. Con questo studio non siamo in grado di dare una risposta a tutte queste domande ma desideriamo far luce sulle caratteristiche cliniche, ecografiche, istopatologiche e molecolari dei carcinomi correlati e associati all'endometriosi in modo da fornire ai clinici maggiore conoscenza di questa patologia.

Nell'ambito di questo studio è stata avviata una proficua collaborazione multidisciplinare tra clinici e ricercatori che ha permesso di analizzare i miRNA espressi dal tessuto tumorale dei carcinomi ovarici correlati all'endometriosi e dall'endometriosi coesistente che nel futuro potrebbe portare a ricercare biomarcatori in grado di diagnosticare precocemente il carcinoma insorto su endometriosi. Sono emerse differenze di notevole rilevanza clinica tra i carcinomi ovarici correlati, associati e non correlati e non associati all'endometriosi. In particolare, abbiamo evidenziato come le pazienti con carcinomi ovarici correlati o associati all'endometriosi presentino un'età alla diagnosi inferiore rispetto ai carcinomi non correlati e non associati a tale patologia. Negli EROC correlati e associati la tumefazione annessiale inoltre è più frequentemente unilaterale e il versamento pelvico è più spesso assente. La valutazione soggettiva dell'ecografista esperto in queste lesioni risulta avere un'accuratezza diagnostica superiore all'applicazione del modello IOTA ADNEX, pertanto, questi casi dovrebbero avere accesso a un'ecografia di II livello in centri specializzati. Nel caso dei carcinomi correlati all'endometriosi la diagnosi avviene in stadi di malattia più iniziali e si può associare ad una lesione neoplastica o preneoplastica dell'endometrio, soprattutto nei carcinomi ovarici endometrioidi. L'espressione del CA 19.9 risulta notevolmente più elevata nei carcinomi correlati all'endometriosi; pertanto, nel sospetto di un'endometriosi cancerizzata risulta cruciale dosare il CA 19.9 nella diagnosi e nel follow-up della neoplasia. L'analisi dell'espressione dei miRNA up e down regolati nel tessuto neoplastico di carcinomi ovarici correlati all'endometriosi

rispetto al tessuto non neoplastico rappresentato dall'endometriosi ha evidenziato differenze significative. Sono state riscontrate differenze di espressione a livello di 42 miRNA che hanno come target il marcatore CA 19.9, nove di questi presentano un sito di legame altamente conservato e di conseguenza un probabile ruolo biologico. Questa analisi è stata condotta nell'ambito di un progetto pilota solo su un piccolo numero di campioni ma nel futuro dovrà essere estesa a tutta la casistica con risultati più consistenti. In conclusione i dati di questa tesi suggeriscono la presenza di importanti differenze tra i carcinomi correlati, associati e non correlati né associati all'endometriosi che necessitano però di essere confermati da ulteriori ricerche al fine di ottenere una casistica più ampia ed eterogenea.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Johnson, N.P.; Hummelshoj, L.; for the World Endometriosis Society Montpellier Consortium; Abrao, M.S.; Adamson, G.D.; Allaire, C.; Amelung, V.; Andersson, E.; Becker, C.; Birna Árdal, K.B.; et al. Consensus on Current Management of Endometriosis. *Human Reproduction* **2013**, *28*, 1552–1568, doi:10.1093/humrep/det050.
2. Zondervan, K.T.; Becker, C.M.; Missmer, S.A. Endometriosis. *N Engl J Med* **2020**, *382*, 1244–1256, doi:10.1056/NEJMra1810764.
3. Audebert, A.; Petousis, S.; Margioulas-Siarkou, C.; Ravanos, K.; Prapas, N.; Prapas, Y. Anatomic Distribution of Endometriosis: A Reappraisal Based on Series of 1101 Patients. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **2018**, *230*, 36–40, doi:10.1016/j.ejogrb.2018.09.001.
4. Savelli, L.; Manuzzi, L.; Coe, M.; Mabrouk, M.; Di Donato, N.; Venturoli, S.; Seracchioli, R. Comparison of Transvaginal Sonography and Double-Contrast Barium Enema for Diagnosing Deep Infiltrating Endometriosis of the Posterior Compartment. *Ultrasound Obstet Gynecol* **2011**, *38*, 466–471, doi:10.1002/uog.9072.
5. Koninckx, P.R.; Ussia, A.; Adamyan, L.; Wattiez, A.; Donnez, J. Deep Endometriosis: Definition, Diagnosis, and Treatment. *Fertility and Sterility* **2012**, *98*, 564–571, doi:10.1016/j.fertnstert.2012.07.1061.
6. Suginami, H. A Reappraisal of the Coelomic Metaplasia Theory by Reviewing, Endometriosis Occurring in Unusual Sites and Instances. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **1991**, *165*, 214–218, doi:10.1016/0002-9378(91)90254-O.
7. Viganò, P.; Parazzini, F.; Somigliana, E.; Vercellini, P. Endometriosis: Epidemiology and Aetiological Factors. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **2004**, *18*, 177–200, doi:10.1016/j.bpobgyn.2004.01.007.
8. Wen, X.; Xiong, Y.; Qu, X.; Jin, L.; Zhou, C.; Zhang, M.; Zhang, Y. The Risk of Endometriosis after Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals: A Meta-Analysis of 30 Epidemiology Studies. *Gynecological Endocrinology* **2019**, *35*, 645–650, doi:10.1080/09513590.2019.1590546.
9. Muraoka, A.; Suzuki, M.; Hamaguchi, T.; Watanabe, S.; Iijima, K.; Murofushi, Y.; Shinjo, K.; Osuka, S.; Hariyama, Y.; Ito, M.; et al. Fusobacterium Infection Facilitates the Development of Endometriosis through the Phenotypic Transition of Endometrial Fibroblasts. *Sci Transl Med* **2023**, *15*, eadd1531, doi:10.1126/scitranslmed.add1531.
10. Gaia-Oltean, A.I.; Braicu, C.; Gulei, D.; Ciortea, R.; Miha, D.; Roman, H.; Irimie, A.; Berindan-Neagoe, I. Ovarian Endometriosis, a Precursor of Ovarian Cancer: Histological Aspects, Gene Expression and microRNA Alterations (Review). *Exp Ther Med* **2021**, *21*, 243, doi:10.3892/etm.2021.9674.
11. Nisenblat, V.; Bossuyt, P.M.; Farquhar, C.; Johnson, N.; Hull, M.L. Imaging Modalities for the Non-Invasive Diagnosis of Endometriosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2016**, *2016*, doi:10.1002/14651858.CD009591.pub2.
12. Piketty, M.; Chopin, N.; Dousset, B.; Millischer-Bellaische, A.-E.; Roseau, G.; Leconte, M.; Borghese, B.; Chapron, C. Preoperative Work-up for Patients with Deeply Infiltrating Endometriosis: Transvaginal Ultrasonography Must Definitely Be the First-Line Imaging Examination. *Human Reproduction* **2008**, *24*, 602–607, doi:10.1093/humrep/den405.
13. Hudelist, G.; English, J.; Thomas, A.E.; Tinelli, A.; Singer, C.F.; Keckstein, J. Diagnostic Accuracy of Transvaginal Ultrasound for Non-Invasive Diagnosis of Bowel Endometriosis: Systematic Review and Meta-Analysis: Transvaginal Ultrasound in the Diagnosis of Bowel Endometriosis. *Ultrasound Obstet Gynecol* **2011**, *37*, 257–263, doi:10.1002/uog.8858.
14. Guerriero, S.; Condous, G.; Van Den Bosch, T.; Valentin, L.; Leone, F.P.G.; Van Schoubroeck, D.; Exacoustos, C.; Installé, A.J.F.; Martins, W.P.; Abrao, M.S.; et al. Systematic Approach to Sonographic Evaluation of the Pelvis in Women with Suspected Endometriosis,

- Including Terms, Definitions and Measurements: A Consensus Opinion from the International Deep Endometriosis Analysis (IDEA) Group. *Ultrasound Obstet Gynecol* **2016**, *48*, 318–332, doi:10.1002/uog.15955.
15. Timmerman, D.; Valentin, L.; Bourne, T.H.; Collins, W.P.; Verrelst, H.; Vergote, I. Terms, Definitions and Measurements to Describe the Sonographic Features of Adnexal Tumors: A Consensus Opinion from the International Ovarian Tumor Analysis (IOTA) Group: Definitions for Sonography of Adnexal Tumors. *Ultrasound Obstet Gynecol* **2000**, *16*, 500–505, doi:10.1046/j.1469-0705.2000.00287.x.
 16. Van Holsbeke, C.; Van Calster, B.; Guerriero, S.; Savelli, L.; Paladini, D.; Lissoni, A.A.; Czekierdowski, A.; Fischerova, D.; Zhang, J.; Mestdagh, G.; et al. Endometriomas: Their Ultrasound Characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol* **2010**, n/a-n/a, doi:10.1002/uog.7668.
 17. Becker, C.M.; Bokor, A.; Heikinheimo, O.; Horne, A.; Jansen, F.; Kiesel, L.; King, K.; Kvaskoff, M.; Nap, A.; Petersen, K.; et al. ESHRE Guideline: Endometriosis. *Human Reproduction Open* **2022**, *2022*, hoac009, doi:10.1093/hropen/hoac009.
 18. Oxholm, D.; Breth Knudsen, U.; Kryger-Baggesen, N.; Ravn, P. Postmenopausal Endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* **2007**, *86*, 1158–1164, doi:10.1080/00016340701619407.
 19. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clinicians* **2021**, *71*, 209–249, doi:10.3322/caac.21660.
 20. Guo, S.-W. Endometriosis and Ovarian Cancer: Potential Benefits and Harms of Screening and Risk-Reducing Surgery. *Fertility and Sterility* **2015**, *104*, 813–830, doi:10.1016/j.fertnstert.2015.08.006.
 21. Webb, P.M.; Jordan, S.J. Epidemiology of Epithelial Ovarian Cancer. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **2017**, *41*, 3–14, doi:10.1016/j.bpobgyn.2016.08.006.
 22. Prat, J.; D'Angelo, E.; Espinosa, I. Ovarian Carcinomas: At Least Five Different Diseases with Distinct Histological Features and Molecular Genetics. *Human Pathology* **2018**, *80*, 11–27, doi:10.1016/j.humpath.2018.06.018.
 23. Gadducci, A.; Guerrieri, M.E. PARP Inhibitors Alone and in Combination with Other Biological Agents in Homologous Recombination Deficient Epithelial Ovarian Cancer: From the Basic Research to the Clinic. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **2017**, *114*, 153–165, doi:10.1016/j.critrevonc.2017.04.006.
 24. Querleu, D.; Planchamp, F.; Chiva, L.; Fotopoulou, C.; Barton, D.; Cibula, D.; Aletti, G.; Carinelli, S.; Creutzberg, C.; Davidson, B.; et al. European Society of Gynaecological Oncology (ESGO) Guidelines for Ovarian Cancer Surgery. *Int J Gynecol Cancer* **2017**, *27*, 1534–1542, doi:10.1097/IGC.0000000000001041.
 25. Kvaskoff, M.; Mahamat-Saleh, Y.; Farland, L.V.; Shigeshi, N.; Terry, K.L.; Harris, H.R.; Roman, H.; Becker, C.M.; As-Sanie, S.; Zondervan, K.T.; et al. Endometriosis and Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Human Reproduction Update* **2021**, *27*, 393–420, doi:10.1093/humupd/dmaa045.
 26. Sarriá-Santamera, A.; Khamitova, Z.; Gusmanov, A.; Terzic, M.; Polo-Santos, M.; Ortega, M.A.; Asúnsolo, A. History of Endometriosis Is Independently Associated with an Increased Risk of Ovarian Cancer. *JPM* **2022**, *12*, 1337, doi:10.3390/jpm12081337.
 27. Wentzensen, N.; Poole, E.M.; Trabert, B.; White, E.; Arslan, A.A.; Patel, A.V.; Setiawan, V.W.; Visvanathan, K.; Weiderpass, E.; Adami, H.-O.; et al. Ovarian Cancer Risk Factors by Histologic Subtype: An Analysis From the Ovarian Cancer Cohort Consortium. *JCO* **2016**, *34*, 2888–2898, doi:10.1200/JCO.2016.66.8178.
 28. Berlanda, N.; Somigliana, E.; Viganò, P.; Vercellini, P. Safety of Medical Treatments for Endometriosis. *Expert Opin Drug Saf* **2016**, *15*, 21–30, doi:10.1517/14740338.2016.1121991.
 29. Gadducci, A.; Lanfredini, N.; Tana, R. Novel Insights on the Malignant Transformation of

- Endometriosis into Ovarian Carcinoma. *Gynecological Endocrinology* **2014**, *30*, 612–617, doi:10.3109/09513590.2014.926325.
30. Grandi, G.; Toss, A.; Cortesi, L.; Botticelli, L.; Volpe, A.; Cagnacci, A. The Association between Endometriomas and Ovarian Cancer: Preventive Effect of Inhibiting Ovulation and Menstruation during Reproductive Life. *BioMed Research International* **2015**, *2015*, 1–10, doi:10.1155/2015/751571.
31. Thomas, E.J.; Campbell, I.G. Evidence That Endometriosis Behaves in a Malignant Manner. *Gynecol Obstet Invest* **2000**, *50*, 2–10, doi:10.1159/000052872.
32. Van Gorp, T.; Amant, F.; Neven, P.; Vergote, I.; Moerman, P. Endometriosis and the Development of Malignant Tumours of the Pelvis. A Review of Literature. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **2004**, *18*, 349–371, doi:10.1016/j.bpobgyn.2003.03.001.
33. Mandai, M.; Yamaguchi, K.; Matsumura, N.; Baba, T.; Konishi, I. Ovarian Cancer in Endometriosis: Molecular Biology, Pathology, and Clinical Management. *Int J Clin Oncol* **2009**, *14*, 383–391, doi:10.1007/s10147-009-0935-y.
34. Fukunaga, M.; Nomura, K.; Ishikawa, E.; Ushigome, S. **Ovarian Atypical Endometriosis: Its Close Association with Malignant Epithelial Tumours.** *Histopathology* **1997**, *30*, 249–255, doi:10.1046/j.1365-2559.1997.d01-592.x.
35. Kobayashi, H.; Sumimoto, K.; Kitanaka, T.; Yamada, Y.; Sado, T.; Sakata, M.; Yoshida, S.; Kawaguchi, R.; Kanayama, S.; Shigetomi, H.; et al. Ovarian Endometrioma—Risks Factors of Ovarian Cancer Development. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **2008**, *138*, 187–193, doi:10.1016/j.ejogrb.2007.06.017.
36. Son, J.-H.; Yoon, S.; Kim, S.; Kong, T.-W.; Paek, J.; Chang, S.-J.; Ryu, H.-S. Clinicopathologic Characteristics of Ovarian Clear Cell Carcinoma in the Background of Endometrioma: A Surveillance Strategy for an Early Detection of Malignant Transformation in Patients with Asymptomatic Endometrioma. *Obstet Gynecol Sci* **2019**, *62*, 27, doi:10.5468/ogs.2019.62.1.27.
37. Anglesio, M.S.; Yong, P.J. Endometriosis- Associated Ovarian Cancers.
38. Pearce, C.L.; Templeman, C.; Rossing, M.A.; Lee, A.; Near, A.M.; Webb, P.M.; Nagle, C.M.; Doherty, J.A.; Cushing-Haugen, K.L.; Wicklund, K.G.; et al. Association between Endometriosis and Risk of Histological Subtypes of Ovarian Cancer: A Pooled Analysis of Case–Control Studies. *The Lancet Oncology* **2012**, *13*, 385–394, doi:10.1016/S1470-2045(11)70404-1.
39. Kajihara, H.; Yamada, Y.; Shigetomi, H.; Higashiura, Y.; Kobayashi, H. The Dichotomy in the Histogenesis of Endometriosis-Associated Ovarian Cancer: Clear Cell-Type Versus Endometrioid-Type Adenocarcinoma. *International Journal of Gynecological Pathology* **2012**, *31*, 304–312, doi:10.1097/PGP.0b013e318243a97b.
40. Kajiyama, H.; Suzuki, S.; Yoshihara, M.; Tamauchi, S.; Yoshikawa, N.; Niimi, K.; Shibata, K.; Kikkawa, F. Endometriosis and Cancer. *Free Radical Biology and Medicine* **2019**, *133*, 186–192, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.12.015.
41. Bergamini, A.; Mangili, G.; Ambrosi, A.; Taccagni, G.; Rabaiotti, E.; Bocciolone, L.; Candotti, G.; Cioffi, R.; Pella, F.; Sabetta, G.; et al. Endometriosis-Related Ovarian Cancers: Evidence for a Dichotomy in the Histogenesis of the Two Associated Histotypes. *Diagnostics* **2023**, *13*, 1425, doi:10.3390/diagnostics13081425.
42. Köbel, M.; Kalloger, S.E.; Boyd, N.; McKinney, S.; Mehl, E.; Palmer, C.; Leung, S.; Bowen, N.J.; Ionescu, D.N.; Rajput, A.; et al. Ovarian Carcinoma Subtypes Are Different Diseases: Implications for Biomarker Studies. *PLoS Med* **2008**, *5*, e232, doi:10.1371/journal.pmed.0050232.
43. Gilks, C.B. Molecular Abnormalities in Ovarian Cancer Subtypes Other than High-Grade Serous Carcinoma. *Journal of Oncology* **2010**, *2010*, 1–7, doi:10.1155/2010/740968.
44. Wiegand, K.C.; Shah, S.P.; Al-Agha, O.M.; Zhao, Y.; Tse, K.; Zeng, T.; Senz, J.; McConechy, M.K.; Anglesio, M.S.; Kalloger, S.E.; et al. *ARID1A* Mutations in Endometriosis-Associated Ovarian Carcinomas. *N Engl J Med* **2010**, *363*, 1532–1543,

doi:10.1056/NEJMoa1008433.

45. Kolasa, I.K.; Rembiszewska, A.; Janiec-Jankowska, A.; Dansonka-Mieszkowska, A.; Lewandowska, A.M.; Konopka, B.; Kupryjańczyk, J. PTEN Mutation, Expression and LOH at Its Locus in Ovarian Carcinomas. Relation to TP53, K-RAS and BRCA1 Mutations. *Gynecologic Oncology* **2006**, *103*, 692–697, doi:10.1016/j.ygyno.2006.05.007.
46. Catasús, L.; Bussaglia, E.; Rodríguez, I.; Gallardo, A.; Pons, C.; Irving, J.A.; Prat, J. Molecular Genetic Alterations in Endometrioid Carcinomas of the Ovary: Similar Frequency of Beta-Catenin Abnormalities but Lower Rate of Microsatellite Instability and PTEN Alterations than in Uterine Endometrioid Carcinomas. *Human Pathology* **2004**, *35*, 1360–1368, doi:10.1016/j.humpath.2004.07.019.
47. Kuo, K.-T.; Mao, T.-L.; Jones, S.; Veras, E.; Ayhan, A.; Wang, T.-L.; Glas, R.; Slamon, D.; Velculescu, V.E.; Kuman, R.J.; et al. Frequent Activating Mutations of PIK3CA in Ovarian Clear Cell Carcinoma. *The American Journal of Pathology* **2009**, *174*, 1597–1601, doi:10.2353/ajpath.2009.081000.
48. Yamamoto, S.; Tsuda, H.; Takano, M.; Tamai, S.; Matsubara, O. Loss of ARID1A Protein Expression Occurs as an Early Event in Ovarian Clear-Cell Carcinoma Development and Frequently Coexists with PIK3CA Mutations. *Modern Pathology* **2012**, *25*, 615–624, doi:10.1038/modpathol.2011.189.
49. Stewart, C.J.R.; Leung, Y.; Walsh, M.D.; Walters, R.J.; Young, J.P.; Buchanan, D.D. KRAS Mutations in Ovarian Low-Grade Endometrioid Adenocarcinoma: Association with Concurrent Endometriosis. *Human Pathology* **2012**, *43*, 1177–1183, doi:10.1016/j.humpath.2011.10.009.
50. Martini, M.; Ciccarone, M.; Garganese, G.; Maggiore, C.; Evangelista, A.; Rahimi, S.; Zannoni, G.; Vittori, G.; Larocca, L.M. Possible Involvement of MLH1, p16INK4a and PTEN in the Malignant Transformation of Endometriosis. *Int. J. Cancer* **2002**, *102*, 398–406, doi:10.1002/ijc.10715.
51. Andersen, C.L.; Boisen, M.M.; Sikora, M.J.; Ma, T.; Tseng, G.; Suryawanshi, S.; Vlad, A.; Elishaev, E.; Edwards, R.P.; Oesterreich, S. The Evolution of Estrogen Receptor Signaling in the Progression of Endometriosis to Endometriosis-Associated Ovarian Cancer. *HORM CANC* **2018**, *9*, 399–407, doi:10.1007/s12672-018-0350-9.
52. Bulun, S.; Monsavais, D.; Pavone, M.; Dyson, M.; Xue, Q.; Attar, E.; Tokunaga, H.; Su, E. Role of Estrogen Receptor- β in Endometriosis. *Semin Reprod Med* **2012**, *30*, 39–45, doi:10.1055/s-0031-1299596.
53. Munksgaard, P.S.; Blaakaer, J. The Association between Endometriosis and Ovarian Cancer: A Review of Histological, Genetic and Molecular Alterations. *Gynecologic Oncology* **2012**, *124*, 164–169, doi:10.1016/j.ygyno.2011.10.001.
54. The Cancer Genome Atlas Research Network; Levine, D.A. Integrated Genomic Characterization of Endometrial Carcinoma. *Nature* **2013**, *497*, 67–73, doi:10.1038/nature12113.
55. Concin, N.; Matias-Guiu, X.; Vergote, I.; Cibula, D.; Mirza, M.R.; Marnitz, S.; Ledermann, J.; Bosse, T.; Chargari, C.; Fagotti, A.; et al. ESGO/ESTRO/ESP Guidelines for the Management of Patients with Endometrial Carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* **2021**, *31*, 12–39, doi:10.1136/ijgc-2020-002230.
56. Berek, J.S.; Matias-Guiu, X.; Creutzberg, C.; Fotopoulou, C.; Gaffney, D.; Kehoe, S.; Lindemann, K.; Mutch, D.; Concin, N.; Endometrial Cancer Staging Subcommittee, FIGO Women’s Cancer Committee FIGO Staging of Endometrial Cancer: 2023. *J Gynecol Oncol* **2023**, *34*, e85, doi:10.3802/jgo.2023.34.e85.
57. Cybulska, P.; Paula, A.D.C.; Tseng, J.; Leitao Jr, M.M.; Bashashati, A.; Huntsman, D.G.; Nazeran, T.M.; Aghajanian, C.; Abu-Rustum, N.R.; DeLair, D.F.; et al. Molecular Profiling and Molecular Classification of Endometrioid Ovarian Carcinomas. *Gynecologic Oncology* **2019**, *154*, 516–523, doi:10.1016/j.ygyno.2019.07.012.
58. Krämer, P.; Talhouk, A.; Brett, M.A.; Chiu, D.S.; Cairns, E.S.; Scheunhage, D.A.; Hammond, R.F.L.; Farnell, D.; Nazeran, T.M.; Grube, M.; et al. Endometrial Cancer Molecular

- Risk Stratification Is Equally Prognostic for Endometrioid Ovarian Carcinoma. *Clinical Cancer Research* **2020**, *26*, 5400–5410, doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-1268.
59. D'Alessandris, N.; Travaglino, A.; Santoro, A.; Arciuolo, D.; Scaglione, G.; Raffone, A.; Inzani, F.; Zannoni, G.F. TCGA Molecular Subgroups of Endometrial Carcinoma in Ovarian Endometrioid Carcinoma: A Quantitative Systematic Review. *Gynecologic Oncology* **2021**, *163*, 427–432, doi:10.1016/j.ygyno.2021.08.011.
60. Similä-Maarala, J.; Soovares, P.; Pasanen, A.; Ahvenainen, T.; Vahteristo, P.; Bützow, R.; Lassus, H. TCGA Molecular Classification in Endometriosis-Associated Ovarian Carcinomas: Novel Data on Clear Cell Carcinoma. *Gynecologic Oncology* **2022**, *165*, 577–584, doi:10.1016/j.ygyno.2022.03.016.
61. Stern, R.C.; Haney, A.F. Malignancy in Endometriosis: Frequency and Comparison of Ovarian and Extraovarian Types. *Int J Gynecol Pathol* **2001**, *20*.
62. Zanetta, G.M.; Webb, M.J.; Li, H.; Keeney, G.L. Hyperestrogenism: A Relevant Risk Factor for the Development of Cancer from Endometriosis. *Gynecologic Oncology* **2000**, *79*, 18–22, doi:10.1006/gy.2000.5905.
63. Benoit, L.; Arnould, L.; Cheynel, N.; Diane, B.; Causeret, S.; Machado, A.; Collin, F.; Fraise, J.; Cuisenier, J. Malignant Extraovarian Endometriosis: A Review. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* **2006**, *32*, 6–11, doi:10.1016/j.ejso.2005.08.011.
64. Gadducci, A.; Zannoni, G.F. Endometriosis-Associated Extraovarian Malignancies: A Challenging Question for the Clinician and the Pathologist. *Anticancer Res* **2020**, *40*, 2429–2438, doi:10.21873/anticancer.14212.
65. Palla, V.-V.; Karaolanis, G.; Bliona, T.; Katafigiotis, I.; Anastasiou, I.; Hassiakos, D. Endometrioid Adenocarcinoma Arising from Colon Endometriosis. *SAGE Open Medical Case Reports* **2017**, *5*, 2050313X1774520, doi:10.1177/2050313X17745204.
66. Kobayashi, S.; Sasaki, M.; Goto, T.; Asakage, N.; Sekine, M.; Suzuki, T.; Tsukada, K.; Yamasaki, S.; Ukawa, S. ENDOMETRIOID ADENOCARCINOMA ARISING FROM ENDOMETRIOSIS OF THE RECTOSIGMOID: ENDOMETRIOID ADENOCARCINOMA OF RECTUM. *Digestive Endoscopy* **2010**, *22*, 59–63, doi:10.1111/j.1443-1661.2009.00925.x.
67. Helder-Woolderink, J.M.; Blok, E.A.; Vasen, H.F.A.; Hollema, H.; Mourits, M.J.; De Bock, G.H. Ovarian Cancer in Lynch Syndrome; a Systematic Review. *European Journal of Cancer* **2016**, *55*, 65–73, doi:10.1016/j.ejca.2015.12.005.
68. Bennett, J.A.; Morales-Oyarvide, V.; Campbell, S.; Longacre, T.A.; Oliva, E. Mismatch Repair Protein Expression in Clear Cell Carcinoma of the Ovary: Incidence and Morphologic Associations in 109 Cases. *American Journal of Surgical Pathology* **2016**, *40*, 656–663, doi:10.1097/PAS.0000000000000602.
69. Murphy, M.A.; Wentzensen, N. Frequency of Mismatch Repair Deficiency in Ovarian Cancer: A Systematic Review This Article Is a US Government Work and, as Such, Is in the Public Domain of the United States of America. *Int. J. Cancer* **2011**, *129*, 1914–1922, doi:10.1002/ijc.25835.
70. Konstantinopoulos, P.A.; Lacchetti, C.; Annunziata, C.M. Germline and Somatic Tumor Testing in Epithelial Ovarian Cancer: ASCO Guideline Summary. *JCO Oncology Practice* **2020**, *16*, e835–e838, doi:10.1200/JOP.19.00773.
71. Yamaguchi, M.; Mikami, Y.; Kusunoki, M.; Yoshimura, S.; Motohara, T.; Kondoh, E. Mismatch Repair Protein Deficiency in Endometriosis: Precursor of Endometriosis-Associated Ovarian Cancer in Women with Lynch Syndrome. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* **2023**, *62*, 448–452, doi:10.1016/j.tjog.2022.09.015.
72. Braicu, O.-L.; Budisan, L.; Buiga, R.; Jurj, A.; Achimas-Cadariu, P.; Pop, L.; Braicu, C.; Irimie, A.; Berindan-Neagoe, I. miRNA Expression Profiling in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Endometriosis and Ovarian Cancer Samples. *OTT* **2017**, *Volume 10*, 4225–4238, doi:10.2147/OTT.S137107.
73. Cosar, E.; Mamillapalli, R.; Ersoy, G.S.; Cho, S.; Seifer, B.; Taylor, H.S. Serum microRNAs

- as Diagnostic Markers of Endometriosis: A Comprehensive Array-Based Analysis. *Fertility and Sterility* **2016**, *106*, 402–409, doi:10.1016/j.fertnstert.2016.04.013.
74. Ronsini, C.; Fumiento, P.; Iavarone, I.; Greco, P.F.; Cobellis, L.; De Franciscis, P. Liquid Biopsy in Endometriosis: A Systematic Review. *IJMS* **2023**, *24*, 6116, doi:10.3390/ijms24076116.
75. Van Calster, B.; Van Hoorde, K.; Valentin, L.; Testa, A.C.; Fischerova, D.; Van Holsbeke, C.; Savelli, L.; Franchi, D.; Epstein, E.; Kaijser, J.; et al. Evaluating the Risk of Ovarian Cancer before Surgery Using the ADNEX Model to Differentiate between Benign, Borderline, Early and Advanced Stage Invasive, and Secondary Metastatic Tumours: Prospective Multicentre Diagnostic Study. *BMJ* **2014**, *349*, g5920–g5920, doi:10.1136/bmj.g5920.
76. Moro, F.; Magoga, G.; Pasciuto, T.; Mascilini, F.; Moruzzi, M.C.; Fischerova, D.; Savelli, L.; Giunchi, S.; Mancari, R.; Franchi, D.; et al. Imaging in Gynecological Disease (13): Clinical and Ultrasound Characteristics of Endometrioid Ovarian Cancer: Endometrioid Ovarian Cancer. *Ultrasound Obstet Gynecol* **2018**, *52*, 535–543, doi:10.1002/uog.19026.
77. Pozzati, F.; Moro, F.; Pasciuto, T.; Gallo, C.; Ciccarone, F.; Franchi, D.; Mancari, R.; Giunchi, S.; Timmerman, D.; Landolfo, C.; et al. Imaging in Gynecological Disease (14): Clinical and Ultrasound Characteristics of Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Ultrasound Obstet Gynecol* **2018**, *52*, 792–800, doi:10.1002/uog.19171.
78. Steiert, T.A.; Parra, G.; Gut, M.; Arnold, N.; Trotta, J.-R.; Tonda, R.; Moussy, A.; Gerber, Z.; Abuja, P.M.; Zatloukal, K.; et al. A Critical Spotlight on the Paradigms of FFPE-DNA Sequencing. *Nucleic Acids Research* **2023**, *51*, 7143–7162, doi:10.1093/nar/gkad519.
79. Levine, D.A. Integrated Genomic Characterization of Endometrial Carcinoma. *Nature* **2013**, *497*, 67–73, doi:10.1038/nature12113.
80. D'Alessandris, N.; Travaglino, A.; Santoro, A.; Arciuolo, D.; Scaglione, G.; Raffone, A.; Inzani, F.; Zannoni, G.F. TCGA Molecular Subgroups of Endometrial Carcinoma in Ovarian Endometrioid Carcinoma: A Quantitative Systematic Review. *Gynecologic Oncology* **2021**, *163*, 427–432, doi:10.1016/j.ygyno.2021.08.011.
81. Robinson, J.T.; Thorvaldsdóttir, H.; Winckler, W.; Guttman, M.; Lander, E.S.; Getz, G.; Mesirov, J.P. Integrative Genomics Viewer. *Nat Biotechnol* **2011**, *29*, 24–26, doi:10.1038/nbt.1754.
82. Robinson, J.T.; Thorvaldsdóttir, H.; Wenger, A.M.; Zehir, A.; Mesirov, J.P. Variant Review with the Integrative Genomics Viewer. *Cancer Research* **2017**, *77*, e31–e34, doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-0337.
83. Robinson, J.T.; Thorvaldsdóttir, H.; Turner, D.; Mesirov, J.P. Igv.js: An Embeddable JavaScript Implementation of the Integrative Genomics Viewer (IGV). *Bioinformatics* **2023**, *39*, btac830, doi:10.1093/bioinformatics/btac830.
84. Thorvaldsdóttir, H.; Robinson, J.T.; Mesirov, J.P. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-Performance Genomics Data Visualization and Exploration. *Briefings in Bioinformatics* **2013**, *14*, 178–192, doi:10.1093/bib/bbs017.
85. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. *Genome Biology* **2014**, *15*, 550, doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
86. R, core team R Core Team (2020). — European Environment Agency Available online: <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/oxygen-consuming-substances-in-rivers/r-development-core-team-2006> (accessed on 31 August 2022).
87. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. On the Adaptive Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing with Independent Statistics. *Journal of Educational and Behavioral Statistics* **2000**, *25*, 60–83, doi:10.2307/1165312.
88. Haynes, W. Benjamini–Hochberg Method. In *Encyclopedia of Systems Biology*; Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K.-H., Yokota, H., Eds.; Springer: New York, NY, 2013; pp. 78–78 ISBN 978-1-4419-9863-7.
89. Groth, D.; Hartmann, S.; Klie, S.; Selbig, J. Principal Components Analysis. In *Computational Toxicology: Volume II*; Reisfeld, B., Mayeno, A.N., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2013; pp. 527–547 ISBN 978-1-62703-059-5.

90. varianceStabilizingTransformation: Apply a Variance Stabilizing Transformation (VST) to the... in DESeq2: Differential Gene Expression Analysis Based on the Negative Binomial Distribution Available online: <https://rdrr.io/bioc/DESeq2/man/varianceStabilizingTransformation.html> (accessed on 6 October 2023).
91. EnhancedVolcano: Publication-Ready Volcano Plots with Enhanced Colouring and Labeling Available online: <https://bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/EnhancedVolcano/inst/doc/EnhancedVolcano.html> (accessed on 6 October 2023).
92. Backes, C.; Khaleeq, Q.T.; Meese, E.; Keller, A. miEAA: microRNA Enrichment Analysis and Annotation. *Nucleic Acids Research* **2016**, *44*, W110–W116, doi:10.1093/nar/gkw345.
93. Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V.K.; Mukherjee, S.; Ebert, B.L.; Gillette, M.A.; Paulovich, A.; Pomeroy, S.L.; Golub, T.R.; Lander, E.S.; et al. Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102*, 15545–15550, doi:10.1073/pnas.0506580102.
94. Ashburner, M.; Ball, C.A.; Blake, J.A.; Botstein, D.; Butler, H.; Cherry, J.M.; Davis, A.P.; Dolinski, K.; Dwight, S.S.; Eppig, J.T.; et al. Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology. *Nat Genet* **2000**, *25*, 25–29, doi:10.1038/75556.
95. The Gene Ontology Consortium; Aleksander, S.A.; Balhoff, J.; Carbon, S.; Cherry, J.M.; Drabkin, H.J.; Ebert, D.; Feuermann, M.; Gaudet, P.; Harris, N.L.; et al. The Gene Ontology Knowledgebase in 2023. *Genetics* **2023**, *224*, iyad031, doi:10.1093/genetics/iyad031.
96. The Biochemical Basis of microRNA Targeting Efficacy | Science Available online: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aav1741> (accessed on 8 October 2023).
97. Agarwal, V.; Bell, G.W.; Nam, J.-W.; Bartel, D.P. Predicting Effective microRNA Target Sites in Mammalian mRNAs. *eLife* **2015**, *4*, e05005, doi:10.7554/eLife.05005.
98. Friedman, R.C.; Farh, K.K.-H.; Burge, C.B.; Bartel, D.P. Most Mammalian mRNAs Are Conserved Targets of microRNAs. *Genome Res.* **2009**, *19*, 92–105, doi:10.1101/gr.082701.108.
99. Robin, X.; Turck, N.; Hainard, A.; Tiberti, N.; Lisacek, F.; Sanchez, J.-C.; Müller, M. pROC: An Open-Source Package for R and S+ to Analyze and Compare ROC Curves. *BMC Bioinformatics* **2011**, *12*, 77, doi:10.1186/1471-2105-12-77.
100. McFarland, M.; Quick, C.M.; McCluggage, W.G. Hormone Receptor-negative, Thyroid Transcription Factor 1-positive Uterine and Ovarian Adenocarcinomas: Report of a Series of Mesonephric-like Adenocarcinomas. *Histopathology* **2016**, *68*, 1013–1020, doi:10.1111/his.12895.
101. TargetScanHuman 8.0 Available online: https://www.targetscan.org/vert_80/ (accessed on 9 October 2023).
102. Melin, A.-S.; Lundholm, C.; Malki, N.; Swahn, M.-L.; Sparèn, P.; Bergqvist, A. Hormonal and Surgical Treatments for Endometriosis and Risk of Epithelial Ovarian Cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand* **2013**, *92*, 546–554, doi:10.1111/aogs.12123.
103. Bonavina, G.; Taylor, H.S. Endometriosis-Associated Infertility: From Pathophysiology to Tailored Treatment. *Front. Endocrinol.* **2022**, *13*, 1020827, doi:10.3389/fendo.2022.1020827.
104. Thomsen, L.H.; Schnack, T.H.; Buchardi, K.; Hummelshoj, L.; Missmer, S.A.; Forman, A.; Blaakaer, J. Risk Factors of Epithelial Ovarian Carcinomas among Women with Endometriosis: A Systematic Review. *Acta Obstet Gynecol Scand* **2017**, *96*, 761–778, doi:10.1111/aogs.13010.
105. Ye, J.; Peng, H.; Huang, X.; Qi, X. The Association between Endometriosis and Risk of Endometrial Cancer and Breast Cancer: A Meta-Analysis. *BMC Women's Health* **2022**, *22*, 455, doi:10.1186/s12905-022-02028-x.
106. Mandai, M.; Yamaguchi, K.; Matsumura, N.; Baba, T.; Konishi, I. Ovarian Cancer in Endometriosis: Molecular Biology, Pathology, and Clinical Management. *Int J Clin Oncol* **2009**, *14*, 383–391, doi:10.1007/s10147-009-0935-y.
107. Brunty, S.; Clower, L.; Mitchell, B.; Fleshman, T.; Zgheib, N.B.; Santanam, N. Peritoneal Modulators of Endometriosis-Associated Ovarian Cancer. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 793297,

doi:10.3389/fonc.2021.793297.

108. Fiala, L.; Bob, P.; Raboch, J. Oncological Markers CA-125, CA 19-9 and Endometriosis. *Medicine* **2018**, *97*, e13759, doi:10.1097/MD.00000000000013759.

109. Fassbender, A.; Burney, R.O.; F. O, D.; D'Hooghe, T.; Giudice, L. Update on Biomarkers for the Detection of Endometriosis. *BioMed Research International* **2015**, *2015*, 1–14, doi:10.1155/2015/130854.

110. Xu, T.; Zhang, L.; Jiang, Y.; Wan, Y.; Zhou, S.; Sun, G.; Cheng, W.; Yuan, L. Clinical Characteristics and Serum CA19 -9 Combined with HE4 Are Valuable in Diagnosing Endometriosis-associated Ovarian Cancer. *Intl J Gynecology & Obste* **2023**, *162*, 472–478, doi:10.1002/ijgo.14695.

111. GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search Available online: <https://www.genecards.org/> (accessed on 9 October 2023).

112. Yang, C.; Xia, B.-R.; Zhang, Z.-C.; Zhang, Y.-J.; Lou, G.; Jin, W.-L. Immunotherapy for Ovarian Cancer: Adjuvant, Combination, and Neoadjuvant. *Front Immunol* **2020**, *11*, 577869, doi:10.3389/fimmu.2020.577869.

113. Morand, S.; Devanaboyina, M.; Staats, H.; Stanbery, L.; Nemunaitis, J. Ovarian Cancer Immunotherapy and Personalized Medicine. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 6532, doi:10.3390/ijms22126532.

114. Hoesel, B.; Schmid, J.A. The Complexity of NF- κ B Signaling in Inflammation and Cancer. *Mol Cancer* **2013**, *12*, 86, doi:10.1186/1476-4598-12-86.

115. Roy, R.K.; Yadav, R.; Sharma, U.; Wasson, M.K.; Sharma, A.; Tanwar, P.; Jain, A.; Prakash, H. Impact of Noncoding RNAs on Cancer Directed Immune Therapies: Now Then and Forever. *Int J Cancer* **2022**, *151*, 981–992, doi:10.1002/ijc.34060.

116. Pawłowska, A.; Rekowski, A.; Kuryło, W.; Pańczyszyn, A.; Kotarski, J.; Wertel, I. Current Understanding on Why Ovarian Cancer Is Resistant to Immune Checkpoint Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24*, 10859, doi:10.3390/ijms241310859.

117. Ingersoll, S.B.; Ahmad, S.; Finkler, N.J.; Edwards, J.R.; Holloway, R.W. Cellular Therapy for Ovarian Cancer: Experimental and Clinical Perspectives. *Current Medicinal Chemistry* *19*, 3787–3793.

118. Nawaz, M.; Fatima, F.; Nazarenko, I.; Ekström, K.; Murtaza, I.; Anees, M.; Sultan, A.; Neder, L.; Camussi, G.; Valadi, H.; et al. Extracellular Vesicles in Ovarian Cancer: Applications to Tumor Biology, Immunotherapy and Biomarker Discovery. *Expert Review of Proteomics* **2016**, *13*, 395–409, doi:10.1586/14789450.2016.1165613.