



LINEE GUIDA PER ANALISI GENETICO MOLECOLARI IN PAZIENTI AFFETTI DA MELANOMA METASTICO

Documento redatto da:

Dott.ssa T.Venesio, Dr.ssa A. Balsamo - Laboratorio di Patologia Molecolare, Anatomia Patologica-IRCC, Candiolo- Torino

Dott.ssa M.Scatolini - Laboratorio di Oncologia Molecolare, Fondazione Edo ed Elvio Tempia, Biella

Dipartimento interaziendale ed interregionale
Rete Oncologica del Piemonte e della Valle d'Aosta
A.O. Città della Salute e della Scienza di Torino.
Presidio Ospedaliero Molinette
C.so Bramante n. 88 - 10126 Torino
Segreteria tel-fax 011/6336889 e-mail: ucr@reteoncologica.it

Linee guida per analisi genetico molecolari in pazienti affetti da melanoma metastatico

- *Dott.ssa T.Venesio/ Dr.ssa A. Balsamo- Laboratorio di Patologia Molecolare, Anatomia Patologica-IRCC, Candiolo- Torino*
- *Dott.ssa M.Scatolini- Laboratorio di Oncologia Molecolare, Fondazione Edo ed Elvio Tempia, Biella*
- ***Determinazione dello stato mutazionale del gene BRAF in pazienti affetti da melanoma metastatico***

Indicazioni cliniche dell'analisi mutazionale del gene BRAF

- La determinazione dello stato mutazionale di *BRAF* è indicata per la scelta della migliore strategia terapeutica nei pazienti con melanoma metastatico che possono beneficiare, in presenza di mutazione V600E, del trattamento con inibitori di *BRAF*. A questo proposito lo studio di fase III BRIM-3, condotto su 675 pazienti portatori della mutazione *BRAFV600E*, ha dimostrato una riduzione relativa del 38% del rischio di morte e del 66% del rischio di progressione di malattia nei pazienti trattati con *vemurafenib* rispetto ai pazienti trattati con la sola decarbazina.
- Circa il 50% dei melanomi primari presenta mutazioni della chinasi BRAF, coinvolta nell'attivazione di MAPK. Le mutazioni attivanti più frequenti di *BRAF* sono a carico dell'esone 15: la mutazione V600E rappresenta circa il 90% delle mutazioni di *BRAF* nel melanoma, la V600K ha una frequenza del 6-8% circa mentre altre mutazioni, quali V600R e V600D, sono meno frequenti.
- In base ai dati clinici attualmente disponibili, e' stato proposto che vengano inviati all'analisi mutazionale tutti i casi con linfonodo sentinella positivo (localmente avanzati) ed i metastatici.

Preparazione dei campioni

- Il materiale biologico per l'estrazione del DNA e l'analisi mutazionale del gene *BRAF* nel melanoma può essere ottenuto da campione istologico o, in alternativa, da campione citologico del tumore primitivo e/o della metastasi. Per questo tipo di indagine è comunque preferibile un campione di lesioni metastatiche, nelle quali la

componente di cellule neoplastiche è in genere maggiormente rappresentata rispetto ai melanomi primitivi.

- La macrodissezione su vetrino è da considerarsi fondamentale per una corretta diagnostica molecolare; a tal fine si raccomanda che 3-5 sezioni di 10 micron vengano raccolte su vetrino portaoggetti. L'area da dissezionare viene confrontata con quella prescelta su vetrino colorato con ematossilina-eosina e staccata dal vetrino portaoggetti con una lama da bisturi. Il tessuto dissezionato viene raccolto in una Eppendorf, de-paraffinato con appropriata soluzione deparaffinizzante e sottoposto a lisi enzimatica con la Proteinasi K.

Estrazione e quantificazione del DNA

- L'estrazione e purificazione del DNA da tessuto paraffinato per scopi diagnostici viene generalmente effettuata mediante kit commerciali dedicati che hanno il vantaggio di abbreviare i tempi di esecuzione e di standardizzare le procedure.
- La quantificazione del DNA mediante spettrofotometria o procedure alternative è raccomandabile anche se non sempre indicativa dell'integrità del DNA estratto da materiale fissato. Inoltre la quantificazione risulta non indispensabile nel caso in cui la quantità di materiale biologico sia molto limitata.

Metodiche per lo studio delle mutazioni

Varie strategie sono disponibili per l'analisi delle mutazioni del gene *BRAF*, quelle principalmente utilizzate sono il sequenziamento diretto del prodotto di PCR e il pirosequenziamento.

- Sequenziamento diretto del prodotto di PCR

Il sequenziamento diretto del DNA è attualmente ritenuto il *gold-standard* poiché è in grado di identificare tutte le possibili mutazioni, anche quelle rare. Inoltre, conducendo le analisi su campioni composti per più del 70% da cellule tumorali, è possibile avere un'indicazione sulla quantità di mutazione espressa nel tumore, parametro da non sottovalutare per la scelta di una terapia a bersaglio molecolare. Le mutazioni attivanti del gene *BRAF* sono localizzate nell'esone 15 del gene (generalmente sui codoni 600-602, in rari casi sul codone 597), pertanto l'intero esone o parte di esso devono essere amplificati prima di procedere all'analisi mutazionale. Poiché la tecnologia PCR-sequenziamento non è standardizzata, alcune raccomandazioni devono essere seguite per una corretta analisi.

- Allestire le reazioni di PCR sotto cappa a flusso laminare/verticale o in un ambiente diverso da quello utilizzato per l'analisi dei prodotti di amplificazione, impiegando materiali dedicati e con le opportune precauzioni onde evitare contaminazioni.
- Introdurre almeno un controllo positivo per mutazione ed un controllo negativo (miscela di reazione priva di template).
- Sequenziare il campione in *forward* e *reverse*.
- Considerare il campione come positivo per mutazione solo se questa è presente sia in *forward* che *reverse*.

- Analisi mediante Pirosequenziamento

L'unica metodica in grado di quantificare con precisione l'allele mutato è il pyrosequenziamento, ma con tale analisi non è immediata l'identificazione di quelle mutazioni rare, seppur attivanti la proteina e non ancora previste dai kit commerciali. Il pyrosequenziamento è una tecnologia di sequenziamento mediante sintesi. La tecnica consente di controllare in tempo reale la sintesi del DNA rilevando la bioluminescenza prodotta al termine di una cascata di reazioni enzimatiche innescata dall'incorporazione di un nucleotide. Le metodiche di pirosequenziamento hanno una buona sensibilità, riportata tra il 5% ed il 10%. Rispetto al sequenziamento classico hanno il vantaggio di poter sequenziare frammenti piuttosto corti, superando le problematiche legate alla frammentazione del DNA. Anche utilizzando questa metodologia, opportuni controlli positivi e negativi devono essere impiegati in ogni reazione per ottenere un risultato diagnostico affidabile.

Determinazione dello stato mutazionale dei geni *cKIT* e *NRAS* in pazienti affetti da melanoma metastatico

Negli ultimi anni è stato dimostrato che in un sottogruppo di melanomi delle mucose, acrali e delle zone esposte in maniera cronica alla radiazione ultravioletta possono essere presenti mutazioni nei geni *c-KIT* e *NRAS*, in presenza di un gene *BRAF* normale (Curtin et al, 2006).

Al momento, in Italia è attivo il reclutamento dei pazienti affetti da melanomi con questi istotipi per *trials clinici* con inibitori di c-KIT mutato e MEK attivato. Diventa quindi necessario fornire una diagnostica molecolare completa che permetta di identificare anche questi pazienti.

In base ai dati di letteratura ed all'esperienza maturata negli ultimi due anni si propone che :

- a) le lesioni non foto esposte, i melanomi mucosali, i melanomi acrali o le metastasi viscerali siano sottoposte ad analisi mutazionale del gene *c-KIT* (esoni 9,11, 13, 17, 18)
- b) le lesioni esposte in maniera cronica al sole (volto e mani) vengano analizzate per la presenza di mutazioni sul gene *NRAS* (esoni 2 e 3)

- **Preparazione dei campioni ed estrazione/quantificazione del DNA**

Devono essere seguite le stesse procedure utilizzate per l'analisi del gene *BRAF*.

- **Metodiche per lo studio delle mutazioni**

Per quanto concerne il gene *cKIT*, la complessità e l'eterogeneità delle alterazioni documentate, rende necessario l'utilizzo del sequenziamento diretto dei diversi esoni; per il gene *NRAS* possono essere adottati sia il sequenziamento che il pyrosequenziamento tenendo in considerazione quanto evidenziato già per l'analisi di *BRAF*.