

ma può essere effettuata con metodiche di RealTime PCR che, in generale, possiedono una maggiore sensibilità rispetto agli approcci basati su PCR/sequenziamento. L'impiego della RealTime PCR è facilitato dall'osservazione che nel melanoma le mutazioni predittive di risposta al vemurafenib sono concentrate nel codone 600.

Esistono in commercio numerosi kit per la determinazione delle mutazioni di *BRAF* mediante RealTime PCR. Questi saggi sono in genere basati sulla metodica della discriminazione allelica, alcuni impiegano anche tecniche per la amplificazione preferenziale del DNA mutato (PNA clamp, primer ARMS, etc.). La maggioranza dei kit disponibili è stata disegnata per individuare la sola mutazione V600E. Tuttavia, alcuni kit presentano una documentata reattività crociata anche per altre mutazioni di *BRAF* in posizione V600, quali la V600K e la V600D, e pertanto sono in grado di rilevare anche queste mutazioni. Tra questi vi è il test cobas® 4800, unico ad aver ricevuto in maniera specifica la approvazione all'impiego clinico per la rilevazione di mutazioni *BRAF* V600 in campioni di tessuto di melanoma fissati in formalina e inclusi in paraffina. Il kit include anche una procedura certificata di estrazione di DNA e può essere impiegato solo con strumentazione dedicata. È possibile anche progettare e validare in proprio metodiche di Real Time PCR per la individuazione delle mutazioni di *BRAF*. In questo caso, la metodica deve essere disegnata in modo da rilevare le principali mutazioni V600 di *BRAF*. La sensibilità minima raccomandata è del 10%.

Raccomandazioni generali per la esecuzione di analisi mediante Real Time PCR:

- La elevata sensibilità della RealTime PCR può essere fonte di contaminazioni che possono dare origine a falsi positivi. Per tale motivo, è indispensabile che le reazioni siano allestite sotto cappa a flusso laminare, in un ambiente diverso da quello utilizzato per l'analisi dei prodotti di amplificazione, impiegando materiali dedicati e con le opportune precauzioni (guanti, puntali con filtro, ecc.)
- Appropriati controlli positivi e negativi devono essere sempre inclusi in ogni singola determinazione
- Le reazioni devono di norma essere eseguite in duplicato
- In caso di metodiche sviluppate nei laboratori, queste devono essere validate utilizzando diluizioni di DNA mutato in DNA non-mutato impiegando linee cellulari il cui stato mutazionale di *BRAF* sia conosciuto. Questo approccio è indispensabile per stabilire la sensibilità del saggio ed individuare l'intervallo di deltaCt nell'ambito del quale esso è specifico.

Analisi mediante Ibridazione molecolare su filtro

È disponibile sotto forma di kit commerciale un saggio per l'identificazione della sola mutazione *BRAF* V600E basato sulla PCR e sull'ibridazione inversa. La procedura prevede l'amplificazione tramite PCR con primer biotinilati del DNA in analisi e l'ibridazione dei prodotti amplificati su una striscia contenente sonde oligonucleotidiche allele-specifiche. Le sequenze biotinilate legate alle sonde sono rivelate utilizzando fosfatasi alcalina coniugata con streptavidina e un substrato cromogeno. Il saggio identifica la mutazione V600E con una sensibilità dell'1% circa ed è stato approvato per l'impiego clinico. Il kit è corredato di vari controlli che permettono di monitorare l'efficienza della reazione PCR e dell'ibridazione molecolare.

Refertazione

Diagnostica istopatologica

Il referto istopatologico di melanoma deve comprendere le seguenti informazioni:

1. Una descrizione macroscopica che identifichi i margini di resezione chirurgici e la distanza della neoplasia dal margine più vicino (da riconfermare all'esame al microscopio)

2. Una descrizione microscopica che indichi i parametri istopatologici prognostici importanti ai fini della stadiazione patologica, ed indicazioni ad ulteriori eventuali procedure di stadiazione (biopsia del linfonodo sentinella).

Qualora siano eseguite colorazioni immunoisto-citochimiche queste devono riportate specificando gli anticorpi utilizzati e/o eventuali metodiche FISH con l'indicazione del cut-off utilizzato nella valutazione. Le alterazioni genetico-molecolari devono essere segnalate in dettaglio con la metodica usata per la loro identificazione.

Analisi mutazionale di *BRAF*

Il referto della determinazione dello stato mutazionale di *BRAF* deve contenere le seguenti informazioni:

1. Identificazione del paziente
2. Identificazione del medico/struttura che ha richiesto l'analisi
3. Materiale utilizzato
4. Percentuale di cellule tumorali
5. Metodica/metodiche impiegata/e
6. Mutazioni indagate
7. Risultati del test con specificazione del tipo di mutazione eventualmente rilevata.

Il referto deve essere compilato su un modello prestabilito, e firmato

- dall'anatomo-patologo
- dall'esecutore del test molecolare.

In considerazione dell'impatto dell'esito del test sulla strategia terapeutica, il tempo per la refertazione non deve superare le due settimane dalla richiesta della determinazione.

Bibliografia

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6199-206

Bauer J, Buttner P, Murali R et al. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; 24: 345-51

Chapman PB, Hauschil A, Robert C et al. Improved Survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011; 364:2507-16

Curtin JA, Fridlyand J, Murali R et al. Distinct set of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005; 353: 2135-47

Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363:809-19

Ivan D, Prieto GV. An Update on Reporting Histopathologic Prognostic Factors in Melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135: 825-9

Le Boit PE, Burg G, Weedon D et al. (Eds) World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and genetics of skin tumours. IARC, Lyon, 2006

Questo materiale è stato realizzato grazie ad un grant incondizionato di



Raccomandazioni per la determinazione dello stato mutazionale di *BRAF* nel melanoma

A cura del Gruppo di Lavoro di AIOM e SIAPEC-IAP

AIOM: Referenti Programma Nazionale: Carmine Pinto (Bologna), Nicola Normanno (Napoli); **Esperti:** Paolo Ascierto (Napoli), Alessandro Testori (Milano), Michele Del Vecchio (Milano), Vanna Chiarion Sileni (Padova), Michele Maio (Siena), Paola Queirolo (Genova)

SIAPEC-IAP: Referenti Programma Nazionale: Claudio Clemente (Milano), Gian Luigi Taddei (Firenze); **Esperti:** Massimo Barberis (Milano), Gerardo Botti (Napoli), Guido Collina (Bologna), Gerardo Ferrara (Benevento), Antonio Marchetti (Chieti), Daniela Massi (Firenze), Maria Cristina Montesco (Padova), Stefania Staibano (Napoli)



Raccomandazioni per la determinazione dello stato mutazionale di BRAF nel melanoma

Indicazioni cliniche

La determinazione dello stato mutazionale di *BRAF* è indicata per la scelta della migliore strategia terapeutica nei pazienti con melanoma inoperabile o metastatico (stadio IIIc o IV) che possono beneficiare, in presenza di mutazione V600, del trattamento con inibitori di *BRAF*.

Nel melanoma l'attivazione costitutiva della via di trasmissione del segnale delle "proteinchinasi stimolate dai mitogeni" (ERK/MAPK: Mitogen Activated Protein Kinases) è implicata nella proliferazione, invasione e resistenza all'apoptosi. Circa il 50% dei melanomi presenta mutazioni della chinasi *BRAF*, coinvolta nella attivazione di MAPK. Le mutazioni attivanti più frequenti di *BRAF* sono a carico dell'esone 15. La mutazione V600E, che consiste nella sostituzione della valina con acido glutammico nel codone 600, rappresenta circa il 90 % (88-92%) delle mutazioni di *BRAF* nel melanoma, la V600K ha una frequenza 6-8% circa mentre altre mutazioni, quali la V600R e la V600D, sono meno frequenti.

Lo studio di fase III BRIM-3, condotto su 675 pazienti portatori della mutazione *BRAF*V600E, 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 dacarbazina. L'incremento mediano della PFS è stato di 4 mesi (5,3 con vemurafenib vs 1,6 con dacarbazina) e di 3 mesi circa per la OS (13,2 con vemurafenib vs 9,9 con dacarbazina). La tossicità prevalente è stata cutanea, caratterizzata da fotosensibilizzazione (12%), rash (18%), cheratoacantomi (8%), e carcinomi squamocellulari scarsamente invasivi (12%); artralgie e astenia sono state riportate rispettivamente nel 21% e nel 13% dei casi. L'analisi mediante sequenziamento ha rivelato che alcuni pazienti arruolati nello studio avevano mutazioni diverse dalla V600E, ovvero V600K e V600D.

Inquadramento diagnostico istopatologico

La classificazione istopatologica del WHO oggi ancora utilizzata si basa su criteri morfologici e sull'identificazione delle caratteristiche morfologiche della fase di crescita orizzontale. Questa classificazione comprende 4 principali istotipi: il melanoma a diffusione superficiale, il più frequente, il melanoma su lentigo maligna, il melanoma acrale lentiginoso e il melanoma nodulare, quest'ultimo caratterizzato da assenza di componente proliferativa orizzontale. Istotipi rari sono: il melanoma desmoplastico, il melanoma nevoide, il melanoma spitzoide, il melanoma su nevo, il melanoma mucoso lentiginoso, il nevo blu maligno, e numerose varianti con caratteri citologici peculiari tra le quali il melanoma a piccole cellule, a cellule fuse, a cellule ad anello con castone, il melanoma rabdoide, il melanoma plasmocitoide.

Fattori prognostici morfologici istopatologici sono: lo spessore del tumore, valutato istologicamente dal punto più profondo di invasione sino allo stato granuloso dell'epidermide; la presenza di ulcerazione; il numero di mitosi/mm²; l'evidenza di satellitosi microscopica oltre alla presenza o assenza di metastasi linfonodali o a distanza. Alterazioni genetiche/molecolari nei melanomi sono state correlate con parametri istopatologici e con l'evoluzione clinica. I melanomi a diffusione superficiale presentano più frequentemente mutazioni di *BRAF* mentre i melanomi associati a marcato danno solare, quali i melanomi su lentigo maligna, mostrano più spesso mutazioni di *NRAS* e a volte di *c-KIT*.

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.

Il campione istologico

Il campione istologico può essere rappresentato da lesioni primitive e/o

da lesioni metastatiche (cutanee, linfonodali o viscerali). 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 a quanto osservato nei melanomi primitivi. Il tessuto tumorale può essere prelevato mediante una biopsia incisionale o essere costituito da un campione operatorio. L'indagine molecolare può essere eseguita: 1) su tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE); 2) su campione tissutale fresco; 3) su tessuto congelato a -80°C. L'abituale modalità di conservazione dei campioni tissutali è la fissazione in formalina ed inclusione in paraffina. Il DNA estratto da Tessuti FFPE è frammentato ma idoneo per la ricerca di mutazioni geniche puntiformi note, come quelle che coinvolgono il gene *BRAF*.

Specificità istologiche dei campioni di melanoma

Il campione tissutale ottenuto da una lesione primitiva o metastatica di melanoma può risultare estremamente eterogeneo in quanto può contenere, oltre alla componente tumorale, tessuto normale, aree necrotiche, e cellularità infiammatoria compresi macrofagi contenenti pigmento melanico. La possibilità di identificare mutazioni puntiformi in genere è condizionata dalla percentuale di cellule tumorali ed in parte anche dalla quantità di pigmento melanico, che può alterare l'efficacia di estrazione del DNA. È pertanto utile per questo tipo di tumore una "macro-microselezione" al fine di "arricchire" il campione da sottoporre ad esame molecolare, e di ridurre il più possibile le potenziali interferenze del pigmento melanico sulla qualità del DNA estratto. La presenza di grande quantità di pigmento melanico, infatti, può rappresentare un fattore di inibizione della PCR. Pertanto, devono essere selezionate aree ipopigmentate o non pigmentate. Se questa opzione non è possibile è utile sottoporre le sezioni ad un protocollo di decolorazione (melanin bleach). La metodica di "melanin bleach" è basata su un processo di depigmentazione, che si avvale dell'impiego di una soluzione di permanganato di potassio e di una soluzione di acido ossalico. Le procedure di arricchimento contemplano le metodiche di dissezione (micro e macrodissezione tissutale) e/o di carotaggio, da effettuare preferibilmente su campioni con componente tumorale <50% e senza eccessiva componente melanica.

Dissezione tessutale e sezioni al microtomo

Le dissezioni tissutali possono essere sostanzialmente distinte in: a) microdissezioni laser; b) macrodissezioni eseguite manualmente, su fette distese su vetrino o direttamente sull'inclusione in paraffina; c) carotaggio.

La metodica di *microdissezione laser*, ampiamente utilizzata in ambito di ricerca scientifica, offre potenzialmente il vantaggio di poter selezionare in modo mirato singole cellule tumorali in campioni poco rappresentativi e/o molto eterogenei. Tuttavia, nel contesto clinico tale metodica ha scarsa applicazione a causa dei costi elevati della strumentazione, lunghi tempi di esecuzione, necessità di personale altamente specializzato ed infine possibile insorgenza di artefatti conseguenti alla scarsa quantità e alla qualità sub ottimale del DNA estratto.

La *macrodissezione* manuale permette di arricchire notevolmente il campione di cellule tumorali e di raggiungere, nella maggior parte dei casi, la percentuale di cellule neoplastiche richiesta per l'esame. La macrodissezione su vetrino è da considerarsi ottimale per la diagnostica clinica. Cinque sezioni di 10 micron vengono raccolte su altrettanti vetrini portaoggetto. La raccolta su vetrino si effettua in acqua distillata priva di gelatina, in recipienti monouso (capsula Petri, beaker) al fine di evitare inquinamenti. Le sezioni vengono fatte essiccare sul vetrino a temperatura ambiente. Nel caso in cui, dopo esame istopatologico del preparato su sezione da 4 micron colorata con ematossilina-eosina, si ritenga necessaria la dissezione di un'area tessutale, si provvederà a delimitare l'area prescelta sul vetrino

con un pennarello. Quindi le sezioni "in bianco" da 10 micron adese al vetrino vengono confrontate con l'area selezionata ed opportunamente "dissezionate" (distaccate dal vetrino portaoggetto) con la lama da bisturi. Il tessuto dissezionato viene raccolto in un tubo Eppendorf, sottoposto a sparaffinatura in appropriato solvente, lavato in alcool e disidratato prima di iniziare l'estrazione.

La metodica di *carotaggio*, di non comune impiego, richiede un'apparecchiatura per allestimento di tissue microarray (TMA) e consiste nel "carotare" l'area identificata del tumore, dalla relativa inclusione in paraffina, dopo selezione effettuata su specifica sezione colorata con ematossilina-eosina. Questa procedura consente di ottenere, per una carota del diametro di 1 mm, un quantitativo di DNA congruo per le indagini molecolari che mirano ad evidenziare mutazioni puntiformi, e di selezionare con sufficiente precisione le aree con una minore quantità di pigmento melanico.

Il campione citologico

Il materiale di archivio di campioni citologici è costituito da: 1) preparati citologici strisciati, colorati e montati su vetrino; 2) materiale citologico incluso in blocchi di paraffina (citoinclusi); 3) campioni citologici in sospensione per allestimento di strisci su strato sottile.

Materiale strisciato su vetrino: è necessaria la rimozione del coprioggetto in xilolo per circa 72 ore, seguita da lavaggi del vetrino in etanolo. Le aree del vetrino contenenti il maggior numero di cellule neoplastiche devono essere identificate prima o dopo lo smontaggio del coprioggetto, e le cellule presenti in tali aree saranno rimosse dal vetrino mediante la lama di un bisturi o un ago da siringa e poste in un tubo Eppendorf. Se il campione contiene isolati gruppi microscopici di cellule tumorali, la migliore soluzione sarebbe la microdissezione laser, purtroppo non disponibile in tutti i centri.

Materiale citoincluso: si effettua un congruo numero di sezioni da 10 micron che vengono raccolte in un tubo Eppendorf. Le sezioni sono sparaffinate (vedi sopra), lavate in alcool e disidratate, prima di proseguire con le procedure di analisi. Anche in questo caso, se necessario possono essere effettuate dissezioni manuali o laser.

Campione citologico in sospensione allestito su strato sottile: il materiale biologico può essere ottenuto direttamente dalla sospensione o dai vetrini non colorati, dopo aver verificato la congruità del campione stesso raccolto e concentrato nella specifica area preselezionata di un vetrino all'uopo colorato. Il vetrino colorato occorre per valutare il numero di cellule tumorali presenti nel campione. Il numero ottimale di cellule per le indagini molecolari dovrebbe essere superiore a 100.

Metodiche molecolari

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 rispetto alla metodica classica, basata sull'estrazione in fenolo-cloroformio, e di standardizzare le procedure. La quantificazione del DNA mediante spettrofotometria o procedure alternative è una pratica raccomandabile perché può permettere di ottimizzare il processo di amplificazione e di stabilire il numero degli esami effettuabili a partire dal DNA ottenuto. Tuttavia, la procedura non è indispensabile e può essere evitata nel caso in cui la quantità del materiale biologico disponibile sia molto limitata. Per la valutazione dell'amplificabilità del DNA purificato da tessuti in paraffina, una PCR quantitativa può risultare molto più accurata della spettrofotometria.

Metodiche per lo studio delle mutazioni

Varie strategie sono disponibili per l'analisi delle mutazioni del gene *BRAF*. Oltre al sequenziamento diretto del prodotto della PCR, tecnologia ancora

diffusamente utilizzata in molti laboratori di diagnostica molecolare, sono disponibili altre piattaforme tecnologiche, includenti il pirosequenziamento, la RealTime PCR e l'ibridazione molecolare su filtro, per le quali sono stati sviluppati recentemente vari kit commerciali dedicati. Questi kit diagnostici presentano numerosi vantaggi rispetto al sequenziamento diretto: risultano più rapidi e sensibili, utilizzano protocolli standardizzati, sono in genere forniti di adeguati controlli positivi e negativi, indispensabili per la corretta esecuzione delle analisi, ed in alcuni casi sono stati anche approvati per l'impiego clinico in Europa (CE-IVD). Sebbene quest'ultimo punto non sia al momento un requisito indispensabile per l'attività di diagnostica molecolare, l'approvazione di un saggio per l'impiego clinico rappresenta sicuramente un valore aggiunto rispetto a metodiche sviluppate a scopo di ricerca.

Sequenziamento diretto del prodotto della PCR

Le mutazioni attivanti il gene *BRAF*, attualmente indispensabili per l'uso di farmaci inibitori di *BRAF* nel trattamento del melanoma metastatico, sono localizzate nell'esone 15 del gene. Pertanto, l'intero esone o parte dell'esone devono essere amplificati prima di procedere all'analisi mutazionale mediante sequenziamento. Poiché la tecnologia PCR-sequenziamento non è standardizzata, alcune raccomandazioni devono essere accuratamente seguite per un corretto espletamento dell'esame.

Raccomandazioni generali per la esecuzione di analisi mediante PCR-Sequenziamento:

- Allestire le reazioni PCR sotto cappa a flusso laminare, 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 (guanti, puntali con filtro, ecc.).
- Introdurre almeno un controllo positivo per mutazione (campione di DNA genomico precedentemente validato) ed un controllo negativo (miscela di reazione priva di template).
- Per ogni campione da analizzare, effettuare due distinte reazioni PCR che saranno sottoposte a sequenziamento in forward e reverse, in modo da ottenere un numero di 3-4 sequenze per campione.
- Considerare il campione come positivo per mutazione solo se questa è presente in almeno due diverse sequenze (una forward ed una reverse) ottenute da PCR indipendenti.
- Ad intervalli di 25-30 sequenze, sequenziare dei DNA di controllo per verificare l'assenza di contaminazioni e la qualità della processo.
- Verificare che l'efficienza della procedura garantisca un corretto risultato in almeno il 97% dei campioni e che la sensibilità del metodo non risulti superiore al 20%.

Analisi mediante Pirosequenziamento

Sono disponibili in commercio alcuni Kit per la determinazione delle mutazioni del gene *BRAF* basati sul pirosequenziamento, 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 alcuni vantaggi rispetto al sequenziamento standard, tra cui la maggiore sensibilità (ripotata tra il 5 ed il 10%) e la possibilità di sequenziare frammenti piuttosto corti di DNA, superando in tal modo eventuali 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.

Analisi mediante REAL-TIME PCR

La individuazione delle mutazioni di *BRAF* nei pazienti affetti da melano-