

Tesi di Laurea SPERIMENTALE

**SUPERFICIAL SPREADING MELANOMA IN STADIO I E II, INDIVIDUAZIONE PRECOCE DI  
MUTAZIONI ONCOGENICHE PUNTIFORMI NEL GENE B-RAF**

**ABSTRACT**

**INTRODUZIONE E OBIETTIVI:**

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni si è registrato un incremento significativo dell'incidenza del melanoma con oltre la metà dei casi di prima osservazione già in fase verticale invasiva, dunque destinati alla diffusione metastatica. Pertanto, all'affinamento delle tecniche di prevenzione e diagnosi precoce si è cercato di mettere a punto nuovi presidi terapeutici efficaci nel trattamento del melanoma generalizzato. La realizzazione di queste terapie ha fatto seguito alla scoperta di alcune mutazioni che inducono la trasformazione neoplastica, ed è consistita nella elaborazione di inibitori dei geni mutati, che da soli, o associati a terapie biologiche immunomodulatrici, hanno permesso di prolungare, purtroppo soltanto per alcuni mesi, la vita di pazienti affetti da melanoma metastatico.

OBIETTIVI

La terapia del melanoma negli stadi avanzati consiste oggi nell'impiego di farmaci inibitori delle chinasi mutanti, impiegati singolarmente oppure associati tra di loro o con immunomodulatori. L'impiego di inibitori di chinasi nel trattamento del melanoma avanzato allunga la vita dei pazienti e ne migliora la qualità. Tuttavia, gli effetti di queste nuove terapie si mantengono soltanto per pochi mesi, poiché in seguito alla loro somministrazione prolungata, nuove mutazioni selezionano ceppi di cellule tumorali resistenti agli inibitori B-RAF e MEK, facendo rapidamente progredire la malattia neoplastica.

Lo studio parte dall'ipotesi che almeno alcune delle mutazioni riscontrate nelle fasi avanzate della malattia neoplastica durante terapia specifica con inibitori di BRAF, siano già presenti negli stadi I e II del melanoma, e che i loro effetti si evidenzino in seguito all'espansione selettiva dei cloni cellulari che ne sono portatori. L'obiettivo è stato quello di ricercare, attraverso un'indagine retrospettiva condotta su una serie di casi di Superficial Spreading Melanoma, la presenza di queste mutazioni nel melanoma ancora localizzato alla cute e alle promucose per verificare se già in questo stadio sia possibile ottenere informazioni per una terapia mirata.

La nostra ricerca si è limitata alla sola mutazione puntiforme V600E (Valina-Glutammina, sull'esone 15 del B-RAF), ovvero quella osservata più frequentemente in assenza di fotoesposizione cronica.

**PROCEDURE SPERIMENTALI:**

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto su 40 casi di Superficial Spreading Melanoma escissi e diagnosticati in pazienti afferiti all'Unità Operativa Complessa di Dermatologia e Malattie Sessualmente Trasmesse del Policlinico Universitario "Paolo Giaccone" di Palermo. Presso l'Istituto di Anatomia Patologica del Policlinico sono

state selezionate 80 inclusioni in paraffina, due per ogni melanoma, corrispondenti alla zona centrale della lesione, e da ciascuna di essa sono state tagliate 3 sezioni di 10  $\mu$ , utilizzando il procedimento standard necessario a prevenire la contaminazione del DNA. Dal materiale così ottenuto è stato, quindi, estratto il DNA e le regioni di interesse sono state amplificate ed identificate mediante PCR. Infine, il DNA è stato sequenziato in singolo filamento in direzione anterograda con il metodo della didesossi-terminazione di catena a fluorescenza, utilizzando primer con direzione 5'  $\rightarrow$  3'.

A tale scopo sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- Kit estrazione DNA genomico
- Kit sequenziamento genico
- Kit di amplificazione DNA tramite PCR

L'estrazione del DNA e l'amplificazione mediante PCR sono state eseguite presso il Laboratorio di Genetica Molecolare degli Ospedali Riuniti Villa Sofia-Cervello.

I casi, tutti di Superficial Spreading Melanoma in stadio I o II (da Tis N0 M0 a T4b N0 M0), sono stati suddivisi per età, sesso del paziente, sede della lesione, mentre dal punto di vista istologico/immunoistochimico sono stati considerati i seguenti parametri: microlivello di Clark, spessore Breslow, citotipo, trasformazione intralesionale, ulcerazione, angioinvasività, indice mitotico, indice proliferativo (mib-1).

## **RISULTATI:**

Dei 40 melanomi soltanto 9 (il 22,5%) sono risultati positivi per la mutazione V600E e le loro caratteristiche vengono di seguito riportate in *tabella 1*. Tra i 9 melanomi positivi per la mutazione V600E, 6 casi, vale a dire il 66,6% erano al di sotto del mm. di spessore, una percentuale elevata, sebbene inferiore a quella delle lesioni con lo stesso spessore Breslow calcolata sul totale dei 40 melanomi studiati (29 casi pari al 72,5%). Inoltre il 44,4% (4 su 9) dei casi V600E positivi presentavano il II livello di Clark, a fronte del 70% (28 lesioni) computato sul totale dei casi. Dei 9 melanomi, 4 (il 44,4%) mostravano i segni istologici di un nevo melanocitico preesistente (in tre casi si è trattato di un nevo melanocitico composito comune, in uno di un nevo displastico del quale il melanoma sembrava rappresentare l'evoluzione). In uno dei 4 casi l'insorgenza surnevica era stata evidente anche dal punto di vista clinico, mentre in un altro risultava dall'anamnesi. In confronto, 7 delle lesioni V600E negative (il 22,5%) sono apparse istologicamente surneviche.

## **CONCLUSIONI:**

Dai risultati ottenuti sembra di poter prevedere l'utilità di una terapia con inibitori del B-RAF mutato in melanomi entro lo stadio II, specie se surnevici.

In conclusione, i risultati della ricerca potrebbero suggerire di applicare le stesse tecniche a casi di nuova osservazione, per i quali sarebbe pertanto possibile ottenere precocemente le informazioni necessarie a predisporre terapie mirate con inibitori di geni mutati. A questo punto sembrerebbe ragionevole attuare queste terapie tempestivamente, durante una fase precoce di relativa stabilità genetica, così da prevenire, almeno in parte, la comparsa di resistenze indotte da nuove mutazioni.

**n.3 parole chiave:** melanoma, mutazioni, B-RAF