

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche
CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA



Tesi di Laurea

Dipartimento di medicina Interna e Specialità Mediche
Oncologia Medica

Studio osservazionale retrospettivo sul ruolo della frequenza allelica delle mutazioni BRAF V600 e NRAS in pazienti affetti da melanoma in stadio III non resecabile e stadio IV trattati con terapia target e con inibitori dei checkpoint immunologici.

Relatore

Prof. Francesco Spagnolo

Correlatore

Prof. Matteo Lambertini

Candidato

Ahmad Isa

Anno accademico 2022-2023

INDICE

1	INTRODUZIONE	3
1.1	EPIDEMIOLOGIA	3
1.2	FATTORI DI RISCHIO	5
1.3	PREVENZIONE.....	6
1.4	DIAGNOSI	6
1.5	INDAGINI IMMUNOISTOCHEMICHE.....	7
1.6	CARATTERISTICHE CLINICHE E VARIETÀ MORFOLOGICHE	8
1.7	IL LINFONODO SENTINELLA	10
1.8	ESAME ISTOPATOLOGICO.....	11
1.9	STADIAZIONE	13
2	GENETICA DEL MELANOMA	15
2.1	BRAF.....	16
2.2	NRAS	17
2.3	ALTRE VIE GENETICO-MOLECOLARI	18
3	TERAPIA.....	20
4	RAZIONALE DELLO STUDIO	25
5	METODI	27
6	RISULTATI	28
7	DISCUSSIONE	36
8	BIBLIOGRAFIA	38

1. INTRODUZIONE

Il melanoma è una neoplasia cutanea maligna che origina da una degenerazione dai melanociti, cellule presenti nello strato basale dell'epidermide. La forma più comune è quella cutanea, ma può svilupparsi anche a livello delle mucose e a livello oculare.

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Secondo la relazione di GLOBOCAN, nel 2020 sono stati diagnosticati 324.635 nuovi casi di melanoma. Questo dato lo pone al 17° posto tra i tipi di cancro più comuni.

La mortalità globale nel 2020 è risultata essere di 57000 casi (32000 maschi, 25000 femmine). Il tumore è più frequente tra i maschi con 173844 casi rispetto alle femmine con 150791 casi.¹

In Italia, i dati AIRTUM 2020 hanno evidenziato un aumento dell'incidenza del melanoma con 14.863 nuovi casi. È il terzo tumore più frequente in entrambi i sessi al di sotto di 50 anni.²

Le percentuali di incidenza e di mortalità del melanoma sono stabilmente in incremento negli USA come nella maggior parte d'Europa, mentre la più alta incidenza si registra in Australia ed in Nuova Zelanda. L'aumentata incidenza può essere attribuita sia all'aumentata esposizione ai raggi ultravioletti sia al miglioramento delle tecniche di screening.

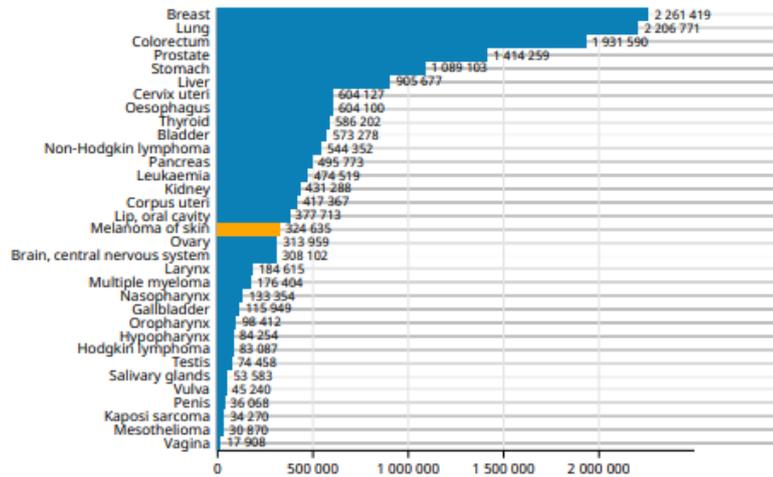


Fig. 1. Numeri di nuovi casi di melanoma nel 2020 globalmente (GLOBOCAN)

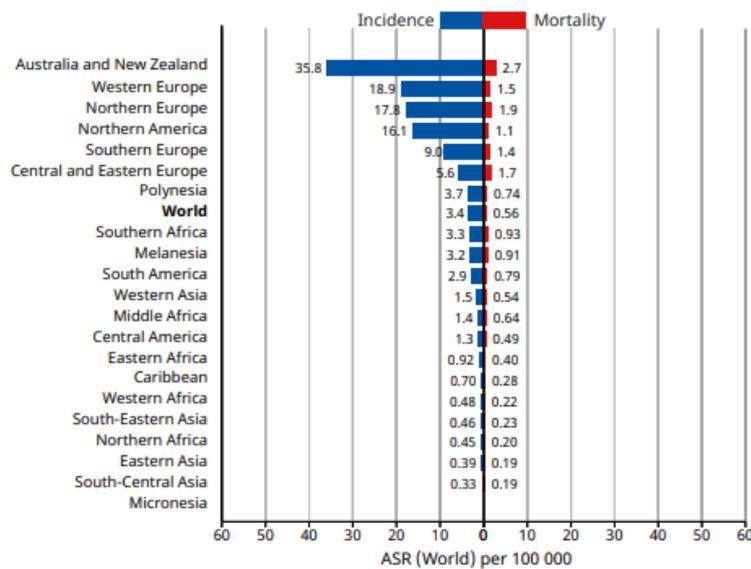


Fig. 2. Tassi di incidenza e mortalità standardizzati per età per 100.000 abitanti (GLOBOCAN).

1.2 FATTORI DI RISCHIO

I fattori di rischio per il melanoma possono essere classificati in tre gruppi ³:

- 1) Familiarità e genetica: è un fattore di rischio intrinseco che aumenta 3-30 volte il rischio di sviluppare il tumore. Comprende:
 - storia familiare per il melanoma
 - mutazioni genetiche che aumentano il rischio di sviluppare un melanoma nell'arco della vita e in alcuni casi allo sviluppo di altre forme di cancro (come in caso di mutazione di CDKN2A, CDK4)

- 2) Fototipo: è un fattore di rischio intrinseco che aumenta 1,6-11 volte il rischio di sviluppare il tumore. Comprende:
 - Fototipo cutaneo (colore di cute/occhi/capelli): i soggetti con rischio maggiore sono quelli con carnagione chiara, occhi chiari, capelli biondi/rossi.
 - Elevato numero di nevi: più di 50 nevi.
 - Presenza di nevi atipici con dimensione più di 5mm

- 3) Acquisti/Ambientali: sono dei fattori di rischio estrinseci, aumentano 2,5-5 volte il rischio di sviluppare il tumore. Comprendono:
 - Esposizione ai raggi ultravioletti
 - Esposizione ai raggi solari soprattutto con scottature nell'infanzia.
 - Esposizione ai raggi UV artificiali.

1.3 PREVENZIONE

La prevenzione primaria ha l'obiettivo di impedire lo sviluppo stesso della malattia, si può attuare rimuovendo i fattori di rischio ambientali, ad esempio attraverso campagne educazionali alla popolazione in merito alla corretta esposizione solare.

I pazienti già sottoposti a fattori di rischio devono essere indirizzati a sottoporsi a visite dermatologiche periodiche per diagnosticare il melanoma in fase precoce (prevenzione secondaria).

È stato evidenziato che l'utilizzo di lettini abbronzanti e lampade solari aumenta il rischio di sviluppare il melanoma nei soggetti meno di 35 anni ⁴ del 75%.

È stato anche dimostrato che il mancato utilizzo di prodotti di protezione solare è un ulteriore fattore di rischio per sviluppare il melanoma⁵.

1.4 DIAGNOSI

La diagnosi inizialmente si basa sulla raccolta della storia clinica del paziente e sull'esame obiettivo, le lesioni cutanee sospette devono essere esaminate con un'adeguata illuminazione coadiuvata da lenti di ingrandimento e dermatoscopio⁶, un esame non invasivo che permette di rilevare caratteristiche morfologiche degli strati superficiali della cute non visibili ad occhio nudo, ed aumenta l'accuratezza diagnostica fino al 20% in più rispetto alla semplice osservazione clinica.

I principali segni d'allarme all'esame obiettivo sono riassunti nell'acronimo ABCDE: Asimmetria, Bordi irregolari, Colore disomogeneo, Dimensione >6 mm, Evoluzione nel tempo.

Nei pazienti con nevi multipli può essere utile individuare il pattern morfologico predominante dei nevi⁷.

Un ulteriore segno utile è il cosiddetto “segno del brutto anatroccolo”⁸, ovvero la presenza di una lesione con caratteristiche morfologiche molto diverse rispetto a quelle dei restanti nevi, se questi invece risultano molto simili tra loro.

1.5 INDAGINI IMMUNOISTOCHEMICHE

L'immunoistochimica può essere utile con alcune colorazioni che aiutano nella discriminazione tra melanociti ed altri tipi cellulari, ma non sono utili nel distinguere tra melanociti benigni e maligni.

La proteina S100: colora nucleo e citoplasma, ed è molto sensibile ma non specifico per il melanoma.

L'HMB45 è un marcatore più specifico per il melanoma, eccezion fatta per alcuni istotipi, come il melanoma desmoplastico.

PMEL17: sensibile, è una proteina dei melanosomi.

Mart1: è un antigene di differenziazione melanocitaria Sensibile ma non specifico, risulta positivo nelle cellule produttrici di steroidi.

P53: è negativo

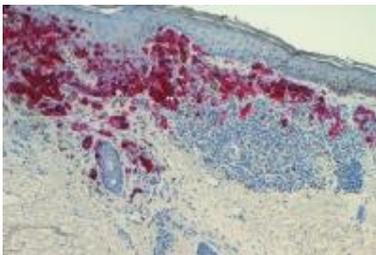


Fig. 3. Melanoma a diffusione superficiale con colorazione immunoistochimica di HBM45⁹.

1.6 CARATTERISTICHE CLINICHE E VARIETÀ MORFOLOGICHE:

Si riconoscono due principali pattern¹⁰:

Frequenza	90%	10%
Evoluzione	Lenta (0.1mm/mese)	Rapida (0.5mm/mese)
Clinica	Lesione asimmetrica pigmentata non palpabile, con margini definiti ma irregolare, dimensione più di 6mm, colore disomogeneo, può rimanere piatta o diventare palpabile	Lesione nodulare palpabile pigmentata o acromica. Spesso ulcerata e ricoperta da crosta squamosa. Ha una crescita verticale già alla diagnosi.
Istologia	Melanoma a diffusione superficiale (70%) Lentigo-maligna melanoma (10%) Melanoma acrale (10%)	Melanoma nodulare
Prognosi	buona	infausta

Tabella 1. Pattern clinici di melanoma

1) MELANOMA A SVILUPPO SUPERFICIALE (SUPERFICIAL SPREADING)

È la forma più comune, interessa soprattutto il tronco e le estremità. Interessa la porzione più superficiale del derma e la giunzione dermo-epidermica. Generalmente, la superficie della lesione è lievemente rilevata, i margini sono palpabili ed irregolari e solitamente comprendono indentature o noduli.



Fig. 4. Immagine clinica di melanoma a diffusione superficiale¹¹

2) LENTIGO MALIGNA:

Forma comune di lesione neoplastica a lento accrescimento, è la forma di melanoma meno aggressiva, la neoplasia interessa solo la giunzione dermo-epidermica.

3) MELANOMA A SVILUPPO NODULARE:

Questa variante di melanoma si presenta generalmente come un nodulo solido e rialzato sulla pelle, di colore scuro o nero. Il melanoma nodulare ha una tendenza maggiore a crescere verticalmente nello spessore della pelle, quindi può rapidamente infiltrarsi nei tessuti circostanti e diffondersi ai linfonodi e ad altri organi viscerali rendendo il trattamento e la gestione della malattia più complessi. Il melanoma nodulare richiede quindi una diagnosi e un intervento tempestivi per massimizzare le possibilità di guarigione e limitare la sua diffusione.

4) MELANOMA ACRALE:

Il melanoma acrale è una forma rara di melanoma che si sviluppa sulle aree della pelle che sono meno esposte alla luce solare, come le mani, i piedi o le unghie. Questo tipo di melanoma può colpire persone di qualsiasi etnia, ma è più comune in individui di pelle più scura. La causa esatta del melanoma acrale non è ancora del tutto chiara, ma si ritiene che fattori genetici e ambientali possano contribuire al suo

sviluppo. Spesso ha una prognosi infausta a causa del ritardo nella diagnosi, poiché può passare inosservato o essere scambiato per altre condizioni cutanee benigne.

5) MELANOMA DESMOPLASTICO:

Tipica dei soggetti adulti-anziani, insorge prevalentemente nelle zone esposte al sole, caratterizzato dalla proliferazione di melanociti immersi in uno stroma di collagene. Si presenta di solito come nodulo o placca non pigmentata.

1.8 IL LINFONODO SENTINELLA

Il linfonodo sentinella nel melanoma è un concetto fondamentale per la stadiazione e la gestione di questa forma di cancro. Il linfonodo sentinella è il primo linfonodo nel quale si ritiene che le cellule tumorali si diffondano dai melanomi primari. Viene identificato attraverso un processo di linfoscintigrafia, durante il quale viene iniettato un tracciante radioattivo o un colorante nel sito del melanoma. Una volta identificato, il linfonodo sentinella viene sottoposto all'exeresi e quindi ad un'analisi accurata per determinare se contiene cellule tumorali. Se il linfonodo sentinella risulta negativo per la presenza di cellule tumorali, è probabile (seppur non certo) che non siano presenti metastasi in altri linfonodi e il trattamento chirurgico potrebbe limitarsi alla rimozione del melanoma primario. In caso di positività del linfonodo sentinella attualmente è indicato l'avvio di una terapia adiuvante, se le condizioni cliniche del paziente non la controindicano. L'analisi del linfonodo sentinella nel melanoma gioca quindi un ruolo fondamentale nel guidare l'approccio terapeutico e nel determinare il rischio di diffusione metastatica.

La biopsia del linfonodo sentinella, in assenza di localizzazioni linfonodali o a distanza di malattia, è indicata a parte dal melanoma pT1b, mentre è opzionale in caso di melanoma pT1a con regressione >75%.

1.9 ESAME ISTOPATOLOGICO

L'esame istopatologico è fondamentale per la diagnosi di melanoma e per definirne la prognosi. Nel referto, oltre alle dimensioni della lesione e alle sue caratteristiche (nodulare/piatta, colore, margini regolare/irregolare, evidenza di aree di regressione), dovrebbero essere riportate le seguenti caratteristiche:

Il tipo istologico¹² : superficiale/nodulare/acrale/mucosale/nevo blu/nevo congenito

Spessore di Breslow¹³: è il fattore prognostico più importante, valuta la profondità dell'invasione delle cellule del melanoma nel tessuto, a partire dallo strato granulare dell'epidermide sovrastante sino al punto più profondo di invasione

Fase di crescita: Orizzontale/Verticale

Ulcerazione: definita come a) la mancanza dell'epidermide a tutto spessore, compreso lo strato corneo; b) la presenza di fenomeni reattivi come depositi di fibrina e neutrofilii; c) iperplasia reattiva o assottigliamento dell'epidermide circostante, in assenza di traumi riportati nella storia clinica¹⁴.

Indice mitotico: Nella componente invasiva del melanoma, l'indice mitotico viene valutato a partire dall'area con maggiore attività mitotica, definita "hot spot", e si estende al conteggio delle mitosi nei campi adiacenti per un'area totale di 1 mm², ha valore prognostico⁴.

Livello di Clark: Nell'attuale sistema di stadiazione AJCC (8^a edizione), il livello di Clark non è incluso, anche se deve essere riportato nel referto istopatologico. Alcuni studi condotti su casi di melanoma con spessore di Breslow inferiore a 1 mm hanno evidenziato il valore prognostico del livello di Clark. Tuttavia, attualmente si ritiene che questo parametro abbia una riproducibilità limitata, soprattutto a causa delle difficoltà nel riconoscere l'interfaccia

tra derma papillare e derma reticolare, specialmente in presenza di marcata elastosi solare dermica.¹⁵

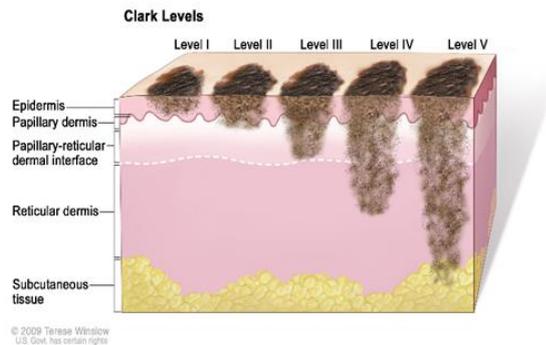


Fig. 5. Il livello di infiltrazione secondo Clark¹⁶

Tumor infiltrating lymphocytes (TILs): possono essere classificate in tre categorie: i) "assenti" (assenza di linfociti o, se presenti, non a contatto con le cellule tumorali); ii) "non brisk" (presenza di aree focali contenenti infiltrati linfocitari all'interno del tumore, isolate, multifocali o segmentali); iii) "brisk" (presenza di un infiltrato linfocitario significativo nel fronte di crescita del tumore o diffusione diffusa all'interno del tumore).

Regressione: La sostituzione/obliterazione parziale o completa delle cellule tumorali, a cui si associa un infiltrato infiammatorio mononucleare, con melanofagi e/o neovascolarizzazione, nonché fibrosi dermica. Alcuni studi dimostrano la regressione come fattore prognostico negativo¹⁷.

Satelliti: la presenza di nidi di cellule tumorale lontani almeno 0.3mm dalla sede principale della neoplasia. La sua presenza condiziona la stadiazione del parametro N⁴.

Invasione linfo-vascolare: fattore prognostico negativo¹⁸.

Neotropismo: presenza di cellule tumorali intorno e all'interno ai nervi. Può essere associato ad un aumentato rischio di recidive, caratterizza pur non interessandolo esclusivamente il melanoma desmoplastico¹⁹.

1.10 STADIAZIONE ²⁰:

Per determinare il **T** del tumore ci si basa sullo spessore di Breslow e sulla presenza/assenza di ulcerazione.

<i>Categoria T</i>	<i>Spessore di Breslow[^]</i>	<i>Ulcerazione</i>
T1 ≤ 1,0 mm		
T1a	a: <0,8 mm	Assente
T1b	b: <0,8 mm	Presente
	0,8-1,0 mm	Assente/Presente
T2 >1,0-2,0 mm		
T2a	a: >1,0-2,0 mm	Assente
T2b	b: >1,0-2,0 mm	Presente
T3 >2,0-4,0 mm		
T3a	a: >2,0-4,0 mm	Assente
T3b	b: >2,0-4,0 mm	Presente
T4 > 4,0 mm		
T4a	a: > 4,0 mm	Assente
T4b	b: > 4,0 mm	Presente

Tabella 2: stadiazione del melanoma secondo l'AJCC 8° edizione - T

N: è una classificazione basata sull'interessamento quantitativo dei linfonodi e sulla presenza di microsatellitosi

<i>Categoria N^{^^}</i>	<i>N° di linfonodi regionali coinvolti</i>	<i>Metastasi in-transit, satelliti, e/o microsatellitosi^{^^^}</i>
N1		
N1a	1 linfonodo coinvolto oppure metastasi in-transit, satelliti, e/o microsatellitosi in assenza di linfonodi regionali coinvolti	a: Assenti
N1b	b: 1 linfonodo dimostrato clinicamente	b: Assenti
N1c	c: Linfonodi regionali non coinvolti	c: Presenti
N2		
N2a	2-3 linfonodi coinvolti oppure metastasi in-transit, satelliti, e/o microsatellitosi con 1 linfonodo regionale coinvolto	a: Assenti
N2b	b: 2 o 3 linfonodi, di cui almeno 1 dimostrato clinicamente	b: Assenti
N2c	c: 1 linfonodo clinicamente occulto o diagnosticato clinicamente	c: Presenti
Categoria N^{^^}		
N3		
N3a	4 o più linfonodi coinvolti oppure metastasi in-transit, satelliti, e/o microsatellitosi con 2 o più linfonodi regionali coinvolti oppure qualsiasi numero di pacchetti linfonodali (linfonodi confluenti) con o senza metastasi in transit, satelliti e/o microsatellitosi	a: Assenti
N3b	b: 4 o più linfonodi, di cui almeno 1 dimostrato clinicamente oppure presenza di pacchetti linfonodali (linfonodi confluenti), in qualsiasi numero	b: Assenti

Tabella 3: stadiazione del melanoma secondo l'AJCC 8° edizione - N

M: Metastasi a distanza

Le metastasi a distanza configura un quadro M1, in base al sito di metastatizzazione si suddivide ulteriormente in stadio M1a/b/c/d

<i>Sede</i>	<i>Sede Anatomica</i>	<i>LDH</i>
M1	Evidenza di metastasi a distanza	
M1a	a: Metastasi a distanza alla cute, tessuti molli compreso il muscolo e/o linfonodi non regionali	Non valutato o non specificato
M1a(0)		Non elevato
M1a(1)		Elevato
M1b	b: Metastasi a distanza al polmone con o senza sedi di malattia M1a	Non valutato o non specificato
M1b(0)		Non elevato
M1b(1)		Elevato
M1c	c: Metastasi a distanza a sedi viscerali diverse dal SNC con o senza sedi di malattia M1a oppure M1b	Non valutato o non specificato
M1c(0)		Non elevato
M1c(1)		Elevato
M1d	d: Metastasi a distanza al SNC con o senza sedi di malattia M1a, M1b oppure M1c	Non valutato o non specificato
M1d(0)		Non elevato
M1d(1)		Elevato

Tabella 4. Stadiazione del melanoma secondo l'AJCC 8° edizione - M

T	N	M	pTNM
Tis	N0	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IA
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	IIA
T3b	N0	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
T0	N1b, N1c	M0	IIIB
T0	N2b, N2c, N3b or N2c	M0	IIIC
T1a/b-T2a	N1a or N2a	M0	IIIA
T1a/b-T2a	N1b/c or N2b	M0	IIIB
T2b/T3a	N1a-N2b	M0	IIIB
T1a-T3a	N2c or N3a/b/c	M0	IIIC
T3b/T4a	Any N \geq N1	M0	IIIC
T4b	N1a-N2c	M0	IIIC
T4b	N3a/b/c	M0	IIID
Any T, Tis	Any N	M1	IV

Tabella 5. Stadiazione patologica secondo l'AJCC 8° edizione

2. GENETICA DEL MELANOMA

Grazie allo sviluppo delle tecnologie di biologia molecolare si è arrivati a una maggior comprensione dei meccanismi patogenetici e molecolari alla base delle neoplasie maligne, compreso il melanoma

Nell' 80% dei melanomi primitivi è stata riscontrata un'attivazione aberrante della via di segnale di MAPK con specifiche mutazioni di proteine della via RAS-RAF-MEK-ERK.

La maggior parte di queste mutazioni sono altamente dipendenti dall'effetto mutageno delle radiazioni ultraviolette.

Il 40-50% dei melanomi presentano mutazioni BRAF, il 20-30% mutazioni NRAS e 10-15% mutazioni in NF1²¹. Tutte queste mutazioni genetiche provocano alterazioni nel funzionamento e un'attivazione costituzionale del MAPK con proliferazione cellulare incontrollata e crescita tumorale²².

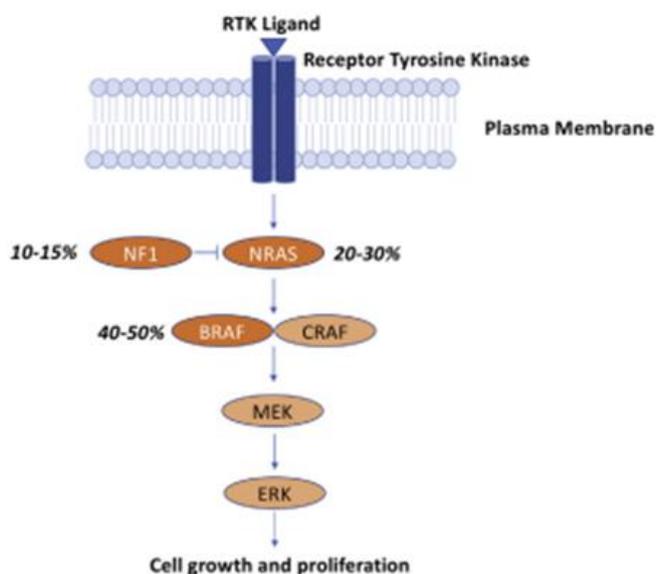


Fig. 6. MAPK pathway²³

2.1 BRAF

Il gene BRAF riveste un ruolo significativo nello sviluppo del melanoma. I melanomi che mostrano questo tipo di mutazione si manifestano in età per lo più giovanile.

Il 70%-88% di queste mutazioni causano una singola sostituzione amminoacidica: la sostituzione di una valina con un acido glutammico al codone 600(V600E)²⁴, un'altra mutazione meno frequente è V600K (sostituzione di una Valina con una Lisina), infine ci sono altri genotipi più rari come V600D, V600R, R600M.

Queste mutazioni inducono la fosforilazione di ERK con l'attivazione di una continua proliferazione e crescita cellulare.

La scoperta delle mutazioni BRAF nel 50% di tutti i melanomi²⁵ ha portato allo sviluppo di una terapia a bersaglio molecolare con BRAF e MEK inibitori, che ha notevolmente migliorato l'outcome dei pazienti con melanoma con mutazione BRAF in stadio IV²⁶.

Pertanto, il test della mutazione BRAF è diventato mandatorio per determinare la scelta della terapia

Infine, alcune varianti genetiche del recettore di membrana Melanocortin-1 Receptor (MC1R) non sono in grado di stimolare adeguatamente la produzione di melanina, che protegge la pelle dai danni causati dai raggi ultravioletti. Quando queste varianti di MC1R sono presenti insieme a un'esposizione ai raggi solari, che sembra in grado ad aumentare la produzione di radicali liberi a livello cutaneo, si ritiene che ciò sia responsabile dell'attivazione oncogenica di BRAF²⁷. Ciò avviene attraverso un aumento indotto dei livelli di AMP ciclico all'interno delle cellule.

2.2 NRAS

NRAS è stato il primo oncogene identificato nel melanoma nel 1984, e la seconda mutazione più diffusa dopo BRAF (frequenza di mutazione del 30%).²⁸

Le mutazioni NRAS si verificano principalmente nella posizione 61 in cui viene sostituita una Glutamina con Arginina, Lisina o Leucina (circa nell'80% dei casi), meno frequentemente, in posizioni 12 e 13 (circa 6%).²⁹

Queste mutazioni rendono la molecola costituzionalmente attiva, in quanto il legame che si forma con il GTP diventa stabile. Svolgono un ruolo chiave nel trasmettere il segnale dal recettore tirosina chinasi (RTK) a diverse vie di segnalazione a valle, in particolare MAPK e PI3K (fosfoinositide3-chinasi)³⁰.

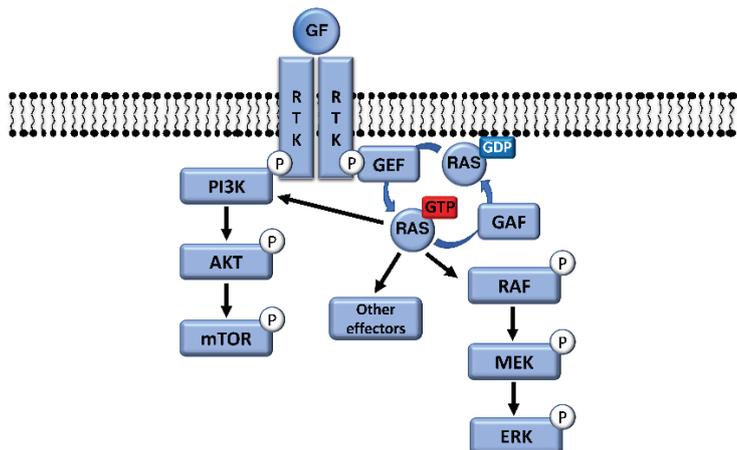


Fig. 7. Via di NRAS³¹

Generalmente, i melanomi che hanno la mutazione NRAS mostrano caratteristiche diverse rispetto a quelli che hanno BRAF mutato: insorgono oltre i 50 anni e in caso di esposizione ai raggi UV, si associano a tumori primitivi più spessi e un alto tasso di mitosi³².

2.3 Altre vie genetico-molecolari coinvolte nella patogenesi del melanoma

CDKN2A

Il gene Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2° (CDKN2A) è un oncosoppressore; lo sviluppo del melanoma è favorito dall'inattivazione di entrambi gli alleli per lo sviluppo del melanoma.

È localizzato sul cromosoma 9p21 e codifica per due proteine: p16CDKN2A e p14CDKN2A.

Fisiologicamente p16 inibisce il sistema CDK4/CCND1, che a sua volta inibisce l'attività antiproliferativa della proteina RB e permette la progressione nel ciclo cellulare. Le due principali alterazioni riscontrate a carico di tale via sono l'inattivazione di p16CDKN2A e l'amplificazione di CCND1.

Invece il p14 interferisce con le proteine Murine Double Minute 2 (MDM2) e p53, prevenendo la degradazione di quest'ultimo e permettendo il suo controllo della progressione del ciclo cellulare. L'inattivazione di p53 può essere dovuta a mutazioni di p14, ad un'aumentata espressione di MDM2 o, in alternativa, al silenziamento del gene TP53.

PI3K: Fisiologicamente PTEN riduce i livelli di PIP2 e PIP3, invece PI3K aumenta i livelli intracellulare di PIP3 che vanno ad attivare AKT e il suo substrato mTOR, il quale è responsabile della modulazione della sintesi di proteine coinvolte nella crescita cellulare nonché nell'apoptosi. La combinazione della perdita di PTEN e dell'attivazione del sistema PI3K-AKT nel melanoma porta a una crescita anomala delle cellule tumorali e alla capacità di resistere all'apoptosi.

MITF: Le mutazioni oncogeniche di BRAF portano all'attivazione costitutiva di ERK, MITF viene fosforilato da ERK stimolandone così l'attivazione, ma causandone anche la degradazione attraverso il percorso ubiquitina-proteosoma, derivandone così sia la degradazione di MITF sia la sua attivazione. All'interno delle cellule di melanoma, MITF interagisce con vari effettori che svolgono azioni contrastanti. Ad esempio, CDK2 e BCL-2 promuovono la progressione del ciclo cellulare e la riduzione dell'apoptosi, favorendo così la proliferazione tumorale. D'altra parte, p21 e p16 inducono l'arresto del ciclo cellulare e attivano i meccanismi di senescenza cellulare.

c-KIT: Particolari mutazioni nel gene c-KIT causano un'attivazione costitutiva del dominio chinasi, portando a una continua induzione della proliferazione cellulare mediante la stimolazione del pathway MAPK.

3. TERAPIA

La terapia chirurgica: Il trattamento prevede un'escissione ampia della lesione primitiva (dopo aver ottenuto la diagnosi istologica tramite l'exeresi completa della lesione) con margini liberi, ovvero la rimozione di porzione di tessuto sano che circonda la lesione asportata.

L'ampiezza dei margini liberi di tutti i melanomi dipende dallo spessore secondo Breslow:

Spessore di Breslow (mm)	Classificazione TNM	Margini liberi
Melanoma in situ	pTis	0.5mm
≤1	pT1	1 cm
>1-2	pT2	1 – 2 cm
>2-4	pT3	2 cm
>4	pT4	2 cm

In caso di spessore di Breslow ≥ 0.8 mm è indicata anche l'esecuzione della biopsia del linfonodo sentinella.

In caso invece di localizzazioni linfonodali apprezzabili clinicamente (con l'esame obiettivo e/o con gli esami strumentali), si procede alla dissezione del bacino linfonodale. In caso di linfonodi positivi all'esame istologico, in assenza di localizzazioni a distanza, è indicato l'avvio di una terapia adiuvante.

Trattamento sistemico del melanoma

Immune-checkpoint inibitori: Anti-CTLA-4: Ipilimumab

CTLA-4 blocca il legameco-stimolatorio tra il recettore CD28, espresso sulla superficie delle cellule T e le molecole CD80/CD86(B7). Il legame tra CD28 e CD80/CD86durante la attivazione delle cellule T, porta all'attivazione di un segnale inibitorio. L'anticorpo anti CTLA-4 va a inibire il segnale inibitorio portando così ad una attivazione delle cellule T che attaccano le cellule tumorali.

Immune-checkpoint inibitori: anti-PD-1: Nivolumab e Pembrolizumab

A differenza di Ipilimumab, Nivolumab e pembrolizumab sono due anticorpi diretti contro PD1. Il PD-1 è una proteina presente sulla superficie delle cellule T che ha la funzione di “freno” nell'attivazione del sistema immunitario. Tuttavia, alcune cellule tumorali sfruttano il PD-1 per rendersi irriconoscibili dal sistema immunitario. Gli anticorpi anti-PD-1 si legano al recettore PD-1, bloccando così l'interazione con le proteine che lo attivano (come PD-L1 e PD-L2) presenti sulle cellule tumorali. Ciò permette alle cellule T di mantenere un'attività antitumorale più potente, rafforzando la risposta immunitaria contro il cancro. Gli anticorpi anti-PD-1 sono stati approvati per il trattamento di diverse neoplasie maligne, oltre al melanoma avanzato, tra gli altri, anche il carcinoma polmonare non a piccole cellule, carcinoma uroteliale avanzato, linfoma di Hodgkin classico e carcinoma del rene avanzato.

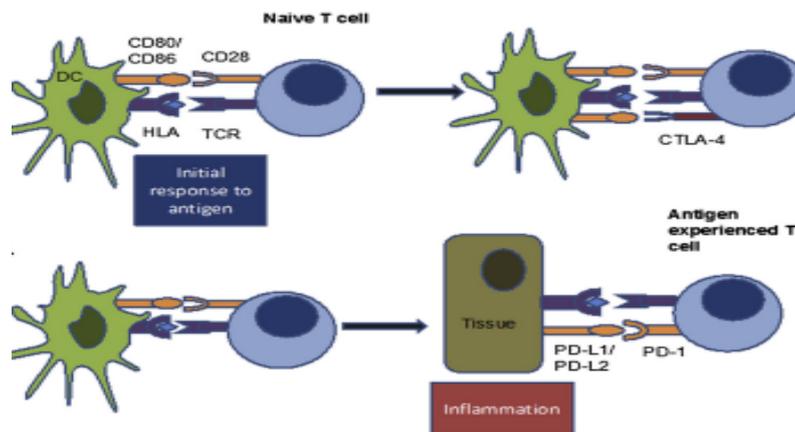


Fig. 8³³ meccanismo d'azione di CTLA-4 e PD-1

Si è evidenziato che il Nivolumab è più efficace rispetto a Ipilimumab. Inoltre, è stato associato a un tasso inferiore di eventi avversi correlati al trattamento, con solo meno del 10% dei pazienti che interrompono il trattamento a causa della tossicità rispetto a 43% dei pazienti che hanno ricevuto Ipilimumab³⁴.

Targeted therapy: L'identificazione delle mutazioni somatiche BRAF V600 in circa il 50% dei melanomi ³⁵ ha portato allo sviluppo di inibitori di MAP-chinasi altamente attive; i BRAF inibitori Vemurafenib e Dabrafenib che hanno dimostrato un beneficio staticamente significativo in termini di overall survival (OS) e progressione-free survival (PFS) e overall response rate (ORR) rispetto alla chemioterapia ³⁶.

È stata dimostrato anche l'efficacia del trattamento combinato tra BRAF-inibitori e MEK-inibitori (Trametinib) rispetto al singolo trattamento di BRAF-inibitori, in quanto si riducono gli effetti collaterali dei BRAF inibitori quando sono utilizzati in monoterapia (effetto paradossale), si rallenta lo sviluppo delle resistenze e generano effetto sinergico di efficacia.³⁷

L'associazione di Dabrafenib con Trametinib ha ricevuto la approvazione del FDA nel 2014 dopo la dimostrata sicurezza ed efficacia di questa combinazione in termini di ORR e PFS rispetto alla monoterapia di Dabrafenib nei pazienti con melanoma avanzato/metastatico BRAF V600E/K mutato.³⁸

Nella fase 3 di trial di COMBI-d è dimostrato che questa combinazione si riduce il rischio di morte di 29% rispetto alla monoterapia, con OS di 3 anni in 44% rispetto a 32% con monoterapia³⁹.

È stata anche approvata la combinazione tra Vemurafenib e Cobimetinib da parte dal FDA dopo l'evidenza di questa combinazione in termini di vantaggio in ORR e PFS e OS.⁴⁰

Nella fase 3 dello studio COLUMBUS, è stata dimostrata la efficacia della combinazione di Encorafenib e Binimetinib rispetto alla monoterapia con Veumurafenib in termini di OS a 5 anni (47% vs 31%), con riduzione di rischio di morte del 39%.⁴¹

Gli effetti collaterali più comuni di queste combinazioni di farmaci sono piressia, stanchezza e nausea. Nonostante questo, la tossicità del trattamento non ha influenzato negativamente la qualità della vita dei pazienti.

Combinazione Ipilimumab+Nivolumab: Per quanto riguarda il setting metastatico è disponibile anche la combinazione di immunoterapici Nivolumab+Ipilimumab. In Italia questa combinazione è prescrivibile solo in caso di assenza di espressione di PD L1 all'immunoistochimica e/o in caso di presenza di metastasi cerebrali asintomatiche.

L'approvazione è arrivata alla luce dei dati dello studio CheckMate 067 (studio a tre bracci che confrontava la combinazione di ipilimumab+nivolumab vs nivolumab vs ipilimumab), in cui la combinazione ha portato, a un follow up minimo di 6.5 anni, a una OS mediana di 72,1, 36,9 e 19,9 mesi rispettivamente nei 3 bracci. Vantaggio mantenuto indipendentemente dalla mutazione di BRAF, infatti le percentuali di OS a 6,5 anni erano rispettivamente del 57%, 43% e 25% nei pazienti con tumori BRAF-mutanti e del 46%, 42% e 22% in quelli con tumori BRAF-wild-type. Tuttavia, questa combinazione è gravata da una non trascurabile percentuale di effetti collaterali gastrointestinali ed epatici, nonché cutanei ed endocrinologici.

4. RAZIONALE DELLO STUDIO

La presenza della mutazione BRAFV600 in circa il 50% dei pazienti con melanoma costituisce il razionale per l'utilizzo di terapia target BRAF inibitorio/MEK inibitorio sia nel setting adiuvante con RFS a 1 anno di 88% che metastatico con PFS mediano di 12-14 mesi.

Anche la terapia con checkpoint inibitori una valida scelta per pazienti BRAF wild type, BRAF mutato e NRAS mutato. Quando sono utilizzati in prima linea hanno una PFS di 6-9 mesi, invece, una PFS di 4-6 mesi se utilizzata in seconda linea.

Recenti pubblicazioni hanno riportato che la frequenza allelica della mutazione BRAF potrebbe correlare con le caratteristiche del tumore sia primitivo che metastatico (sede e numero di metastasi). Anche le caratteristiche dell'infiltrato linfocitario possono essere influenzate dalla frequenza allelica, in quanto, una elevata Frequenza allelica si associa con infiltrato linfocitario più elevato.

Inoltre, si è ipotizzato che una variazione nella frequenza allelica della mutazione BRAF potrebbe influenzare la risposta al trattamento con farmaci target anti-BRAF/anti-MEK e alla terapia immunologica con checkpoint inibitori. Quest'ultima viene spesso utilizzata come opzione terapeutica di seconda linea nei pazienti con mutazione BRAF e come prima scelta nei pazienti con BRAF-wild type.

Infine, i pazienti con mutazione NRAS che rappresentano circa 20% dei casi, sono candidati al trattamento in prima linea con i checkpoint inibitori con tasso di risposta obiettiva di circa 40% e PFS di 5-7 mesi, ed è stato riportato percentuali più elevate di risultati clinici migliori nei pazienti con NRAS mutato rispetto ai pazienti con NRAS-wild type.

Tuttavia, tali risultati non sono stati confermati da studi più recenti condotti su popolazioni più ampie. Pertanto, è possibile ipotizzare che una diversa frequenza allelica della mutazione NRAS possa essere responsabile di una risposta diversa ai checkpoint inibitori.

Il nostro studio mira a esplorare il ruolo predittivo della frequenza allelica delle mutazioni BRAF e NRAS in una popolazione di pazienti con melanoma, che sono stati uniformemente trattati, sia nel contesto adiuvante (stadio III) che nel contesto metastatico (stadio IV), utilizzando terapie target e checkpoint inibitori.

5. METODI

In questo studio retrospettivo abbiamo valutato retrospettivamente pazienti con mutazione BRAF e NRAS in stadio III non resecabile e IV, trattati con terapia target o immunoterapia presso il nostro centro tra il 2016 e il 2023, e di cui la mutazione fosse stata valutata tramite metodica NGS.

Di ciascun melanoma sono state valutate le caratteristiche istologiche; lo spessore secondo Breslow, il numero di mitosi, la presenza di infiltrato linfocitario intra-tumorale, la presenza di ulcerazione e regressione.

Lo studio ha l'obiettivo di valutare le correlazioni tra frequenza allelica delle mutazioni di BRAF V600E e caratteristiche cliniche-patologiche di pazienti affetti da melanoma con mutazione BRAF V600E in stadio III e IV (spessore di Breslow del tumore primitivo, infiltrato linfocitario, sedi di malattia primitiva e metastatica, livelli LDH); valutare le correlazioni tra la frequenza allelica di BRAF e l'efficacia del trattamento sistemico con farmaci anti-BRAF/anti-MEK sia nel contesto adiuvante che nel contesto metastatico (la sopravvivenza libera da progressione; PFS e la sopravvivenza totale; OS); indagare le correlazioni tra la frequenza allelica di NRAS e l'efficacia del trattamento di prima linea con checkpoint inibitori (PFS, OS); esaminare le correlazioni tra la frequenza allelica di BRAF e l'efficacia del trattamento con checkpoint inibitori utilizzati come seconda linea di terapia.

6. RISULTATI

Nella nostra casistica abbiamo preso in considerazione 48 pazienti con melanoma; 28 pazienti (62%) hanno il gene BRAF mutato; invece, gli altri 17 pazienti (38%) hanno mutazione NRAS.

Di ciascun melanoma sono state valutate le caratteristiche istologiche; lo spessore secondo Breslow (spessore medio 6.1mm), il numero di mitosi (numero di mitosi medio 7.4/mm²), la presenza di infiltrato linfocitario intra-tumorale (24 pazienti, 50%), la presenza di ulcerazione (22 pazienti, 45%) e regressione (8 pazienti, 17%).

Gruppo di pazienti con melanoma BRAF mutato

Per quanto riguarda i pazienti affetti da melanoma BRAF mutato, i pazienti di sesso maschile sono 19 (68%) e quelli di sesso femminile (32%). L'età dei pazienti è compresa tra 30 – 89 con età media di 47anni. La mutazione più frequente di BRAF è la mutazione BRAF V600E che è stata riscontrata in 25 pazienti (89%), mentre 3 pazienti (11%) hanno BRAF V600K. 13 pazienti (46%) presentano una frequenza allelica elevata (>45.5%, valore mediano) e 15 pazienti (54%), invece, presentano una frequenza allelica bassa (Tabelle 6-7).

Tutti i pazienti hanno ricevuto una terapia di combinazione con inibitori di BRAF+MEK.

I pazienti con frequenza allelica **elevata** di **BRAF** hanno avuto **PFS mediano di 9 mesi** e **OS mediana di 15,5 mesi**. Invece, i pazienti con **bassa** frequenza allelica di **BRAF** hanno mostrato una **PFS mediana di 4 mesi** e **OS mediana di 8,5 mesi**. **Quindi, i pazienti con frequenza allelica elevata avevano valori di PFS e OS più alti rispetto ai pazienti con frequenza allelica bassa.**

Per quanto riguarda il tasso di risposte (Tabella 8), tra tutti i pazienti con melanoma BRAF mutato, 5 (21%) avevano malattia progressiva (PD), e 1 (4%) aveva malattia stabile (SD). Invece, di quelli che avevano risposta, 2 (8%) pazienti avevano risposta completa (RC), 16 (67%) avevano risposta parziale (RP).

Tra i pazienti con **frequenza allelica elevata**, 1 (9%) aveva malattia progressiva (PD), e nessuno aveva malattia stabile (SD), 1 (9%) aveva risposta completa (RC), 9 (82%) avevano risposta parziale (RP).

Invece, i pazienti con **frequenza allelica bassa**, 1 (7%) aveva risposta completa (RC), 7 (54%) avevano risposta parziale (RP), 4 (32%) avevano malattia progressiva (PD), 1 (7%) aveva malattia stabile (SD).

	Media	
Età alla diagnosi (anni)	47	30-89
	Numero pazienti (n=28)	Percentuale %
Sesso		
Femmine	9	32%
Maschi	19	68%
Mutazione BRAF		
BRAF V600E	25	89%
BRAF V600K	3	11%
Frequenza allelica		
Alta	13	46%
bassa	15	54%
Sede di Metastasi		
Polmone	11	39%
Encefalo	4	14%
Fegato	6	21%
Linfonodi	10	36%
Altro	7	25%
Stadio della malattia metastatica		
M1a	8	28%
M1b	5	18%
M1c	11	39%
M1d	4	15%
Progressione dopo trattamento		
Progredito	21	84%
Non progredito	4	16%

Tabella 6. Caratteristiche dei pazienti con melanoma BRAF mutato

Frequenza allelica	Elevata	Bassa
Caratteristiche cliniche		
spessore di Breslow del tumore primitivo (mediana)	4.17	5.6
Infiltrato linfocitario		
Presente brisk	1	1
Presente non brisk	6	6
Non presente	1	1
Sede di malattia primitiva		
Arti superiore	1	2
Arti inferiore	2	3
Capo	1	4
Tronco	6	4
Sede di Metastasi		
Polmone	6	4
Encefalo	2	2
Fegato	3	3
Linfonodi	6	5
altro	5	5
Livelli LDH		
Alti	9	10
bassi	3	3
Tipo di melanoma		
SSM	3	7
Nodulare	4	5
Altro	3	0
Indice mitotico (mediano)	8.5	4
Regressione	3 (50%)	4 (33%)
Ulcerazione	7(87.5%)	7(54%)

Tabella 7. Caratteristiche per frequenza allelica di BRAF nel gruppo di pazienti con melanoma BRAF mutato

Tipo di risposta	Totale		Frequenza allelica elevata		Frequenza allelica bassa	
RC	2	8%	1	9%	1	7%
RP	16	67%	9	82%	7	54%
PD	5	21%	1	9%	4	32%
SD	1	4%	0	0%	1	7%

Tabella 8. Attività clinica della terapia con inibitori di BRAF+MEK nel gruppo di pazienti con melanoma BRAF mutato

Gruppo di pazienti con melanoma NRAS mutato

I pazienti di sesso maschile con **NRAS** mutato sono 10 (59%), e quelli di sesso femminile sono 7 (41%). L'età dei pazienti è compresa tra 40 – 86 anni, con età media di 67. 9 (53%) sono i pazienti con frequenza allelica elevata, e 8 (47%) hanno frequenza allelica bassa (Tabella 9).

Tutti i pazienti con mutazione di NRAS hanno ricevuto una terapia con anti-PD-1 in monoterapia o in combinazione con ipilimumab.

I pazienti con frequenza allelica **elevata** di **NRAS** hanno **PFS mediano di 2 mesi**, ed **OS mediano di 11 mesi** dopo il trattamento con inibitori dei checkpoint immunologici. Invece, i pazienti con frequenza allelica **bassa** di **NRAS** hanno **PFS mediano di 10,5 mesi**, ed **OS mediano di 30 mesi**.

Per quanto riguarda il tasso di risposte (Tabella 10), 2 (12%) pazienti avevano risposta completa (RC), 7 (44%) avevano risposta parziale (RP), 3 (19%) avevano malattia progressiva (PD), e 4 (25%) con malattia stabile (SD). I pazienti con **frequenza allelica elevata**, nessuno aveva risposta completa (RC), 3 (33.3%) avevano risposta parziale (RP), 2 (22,2%) aveva malattia progressiva (PD), e 4 (44.5%) avevano malattia stabile (SD).

Invece, i pazienti con **frequenza allelica bassa**, 2 (29%) aveva risposta completa (RC), 4 (56%) avevano risposta parziale (RP), 1 (14%) avevano malattia progressiva (PD), e nessuno aveva malattia stabile (SD).

	Media	
Età alla diagnosi (anni)	67	40-86
	Numero pazienti (n=17)	Percentuale %
Sesso		
Femmine	7	41%
Maschi	10	59%
Frequenza allelica (rispetto alla mediana)		
Alta	9	53%
bassa	8	47%
Sede di Metastasi		
Polmone	11	39%
Encefalo	4	14%
Fegato	6	21%
Linfonodi	10	36%
Altro	7	25%
Stadio della malattia metastatica		
M1a	10	50%
M1b	1	5%
M1c	7	35%
M1d	2	10%
Progressione dopo trattamento		
Progredito	8	50%
Non progredito	8	50%

Tabella 9. Caratteristiche dei pazienti con melanoma NRAS mutato

NRAS	Totale	Frequenza allelica Elevata	Frequenza allelica Bassa
RC	2 (12%)	0	2 (29%)
RP	7 (44%)	3 (33,3%)	4 (57%)
PD	3 (19%)	2 (22,2%)	1 (14%)
SD	4 (25%)	4 (44,5%)	0

Tabella 10. Attività clinica della immunoterapia nel gruppo di pazienti con melanoma NRAS mutato

GENE	PFS (MESI) (VALORE MEDIANO)		OS (MESI) (VALORE MEDIANO)	
	Frequenza elevata	Frequenza bassa	Frequenza elevata	Frequenza bassa
BRAF	9	4	15,5	8,5
NRAS	2	10.5	11	30

Tabella 11. PFS e OS per frequenza allelica di BRAF e NRAS (i pazienti con melanoma BRAF mutato hanno ricevuto inibitori di BRAF+MEK; i pazienti con melanoma NRAS mutato hanno ricevuto anticorpi anti-PD-1 in monoterapia o in combinazione con ipilimumab)

7. DISCUSSIONE

Nella nostra ricerca volta a evidenziare il ruolo della frequenza allelica delle mutazioni BRAF V600 e NRAS nei pazienti affetti da melanoma in stadio III non resecabile e stadio IV trattati con terapia target e inibitori dei checkpoint immunologici, i nostri risultati includono quanto segue:

1. Una frequenza allelica elevata della mutazione BRAF è associata a un aumento della sopravvivenza libera da progressione (PFS).
2. Una frequenza allelica elevata della mutazione BRAF è associata a un aumento della sopravvivenza complessiva (OS).

I nostri risultati sono in linea con uno studio recente condotto da Berrino et al.⁴², che ha analizzato la frequenza allelica in 327 pazienti in diversi stadi clinici e ha riportato un miglior risultato nei pazienti con frequenza allelica elevata. Inoltre, lo studio di Satgni et al⁴³. ha dimostrato una PFS più lunga (mediana di 12 mesi) nei pazienti con frequenza allelica elevata rispetto a quelli con frequenza allelica bassa. Tuttavia, lo studio di Mandalà M et al⁴⁴. ha rilevato che l'elevata frequenza allelica è associata a una PFS e OS più breve e ha considerato la frequenza allelica elevata come un fattore prognostico debole nei pazienti trattati con inibitori di BRAF e MEK. In contrasto con i nostri risultati, uno studio condotto da Lebbe et al⁴⁵. ha evidenziato una risposta inferiore e risultati peggiori nei pazienti con frequenza allelica elevata che hanno ricevuto solo l'inibitore di BRAF.

Nella casistica con melanoma NRAS mutato, la nostra analisi ha evidenziato quanto segue:

1. Una frequenza allelica bassa della mutazione NRAS è associata a un aumento della PFS.
2. Una frequenza allelica bassa della mutazione NRAS è associata a un aumento della OS.

Lo studio condotto da Johnson, Douglas B. et al.⁴⁶ ha riportato che i pazienti con mutazione NRAS trattati con immunoterapia hanno ottenuto risultati migliori, benefici clinici e una PFS più lunga rispetto ai pazienti con tipo wild di NRAS. D'altra parte, lo studio condotto da Hélias-Rodzewicz et al.⁴⁷ ha indicato che non vi è alcuna differenza significativa in termini di sopravvivenza nei pazienti con una percentuale di mutazione NRAS superiore o inferiore al 60%.⁴⁸

Per quanto riguarda le caratteristiche cliniche del melanoma con mutazione BRAF, abbiamo osservato un miglior fattore prognostico nei pazienti con frequenza allelica elevata, in particolare per quanto riguarda lo spessore di Breslow più basso, senza rilevare alcuna priorità nelle altre caratteristiche. Al contrario, lo studio condotto da Soria, Xavier et al.⁴⁹ ha evidenziato un vantaggio prognostico nei pazienti con frequenza allelica elevata, dove si è osservato uno spessore di Breslow più basso, un indice mitotico più basso e un infiltrato linfocitario più elevato.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ *JAMA Dermatol.* 2022;158(5):495-503. doi:10.1001/jamadermatol.2022.0160
- ² AIOM https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2020/10/2020_Numeri_Cancro-operatori_web.pdf
- ³ Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer.* 2005;41(1):45–60.
- ⁴ Suppa M, Gandini S, Njimi H, et al. Association of sunbed use with skin cancer risk factors in Europe: an investigation within the Euromelanoma skin cancer prevention campaign. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019;33(Suppl 2):76–88
- ⁵ . Green AC, Williams GM, Logan V, Strutton GM. Reduced melanoma after regular sunscreen use: randomized trial follow-up. *J Clin Oncol.* 2011;29(3):257–63.
- ⁶ Argenziano G, Cerroni L, Zalaudek I, et al. Accuracy in melanoma detection: a 10-year multicenter survey. *J Am Acad Dermatol.* 2012;67(1):54–9
- ⁷ Suh KY, Bologna JL. Signature nevi. *J Am Acad Dermatol.* 2009;60(3):508–14
- ⁸ . Grob JJ, Bonerandi JJ. The ‘ugly duckling’ sign: identification of the common characteristics of nevi in an individual as a basis for melanoma screening. *Arch Dermatol.* 1998;134(1):103–4.
- ⁹ F. Cafiero and F. De Cian, Eds., *Current Management of Melanoma.* in *Updates in Surgery.* Cham: Springer International Publishing, 2021. doi: 10.1007/978-3-030-45347-3.
- ¹⁰ Clark WH, Elder DE, Van Horn M. The biologic forms of malignant melanoma. *Hum Pathol.* 1986;17(5):443–50.

Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969;29(3):705–27.
- ¹¹ F. Cafiero and F. De Cian, Eds., *Current Management of Melanoma.* in *Updates in Surgery.* Cham: Springer International Publishing, 2021. doi: 10.1007/978-3-030-45347-3.
- ¹² Elder DE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R, editors. *WHO classification of skin tumours, WHO classification of tumours, vol. 11.* 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2018.
- ¹³ Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1970;172(5):902–8

-
- ¹⁴ Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, et al. Melanoma of the skin. In: AJCC cancer staging manual. 8th ed. Heidelberg: Springer; 2017. p. 563–86.
- ¹⁵ Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res.* 1969;29(3):705–27.
- ¹⁶ http://www.ilmelanoma.it/classific_stadiaz.html
- ¹⁷ Ribero S, Osella-Abate S, Sanlorenzo M, et al. Favourable prognostic role of regression of primary melanoma in AJCC stage I-II patients. *Br J Dermatol.* 2013;169(6):1240–5
- ¹⁸ Kashari-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, et al. Vascular involvement in the prognosis of primary cutaneous melanoma. *Arch Dermatol.* 2001;137(9):1169–73.
- ¹⁹ Hawkins WG, Busam KJ, Ben-Porat L, et al. Desmoplastic melanoma: a pathologically and clinically distinct form of cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2005;12(3):207–13.
- ²⁰ AIOM (Associazione Italiana di Oncologia Medica). Linee guida: Melanoma, ed. 2019. https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2019/10/2019_LG_AIOM_Melanoma-1.pdf
- ²¹ Cancer Genome Atlas Network. Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* 2015;161:1681e96
- ²² Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002; 417: 949-54.
- ²³ Jenkins, Russell W., e David E. Fisher. «Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond». *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 141, fasc. 1, gennaio 2021, pp. 23–31
- ²⁴ Rubinstein, J. C., Sznol, M., Pavlick, A. C., Ariyan, S., Cheng, E., Bacchiocchi, A., et al. (2010). Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *J. Transl. Med.* 8:67. doi: 10.1186/1479-5876-8-67
- ²⁵ The Cancer Genome Atlas Network (2015). Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* 161, 1681–1696. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.044
- ²⁶ Hauschild, A., Grob, J.-J., Demidov, L. V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., et al. (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 380, 358–365. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60868-X

-
- ²⁷ Fargnoli MC, Pike K, Pfeiffer RM et al. MC1R variants increase risk of melanomas harboring BRAF mutations. *J Invest Dermatol.* 2008; 128(10):2485-2490.
- ²⁸ The Cancer Genome Atlas Network (2015). Genomic classification of cutaneous melanoma. *Cell* 161, 1681–1696. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.044
- ²⁹ Lee, J.-H., Choi, J.-W., and Kim, Y.-S. (2011). Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br. J. Dermatol.* 164, 776–784. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.10185.x
- ³⁰ Vanni, Irene, et al. «Non-BRAF Mutant Melanoma: Molecular Features and Therapeutical Implications». *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 7, 2020, p. 172. *PubMed*, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00172>.
- ³¹ Dumaz, Nicolas, et al. «Atypical BRAF and NRAS Mutations in Mucosal Melanoma». *Cancers*, vol. 11, fasc. 8, agosto 2019, p. 1133.
- ³² Vanni, Irene, et al. «Non-BRAF Mutant Melanoma: Molecular Features and Therapeutical Implications». *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 7, 2020, p. 172. *PubMed*, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00172>.
- ³³ Queirolo, Paola, et al. «Immune-Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Metastatic Melanoma: A Model of Cancer Immunotherapy». *Seminars in Cancer Biology*, vol. 59, dicembre 2019, pp. 290–97.
- ³⁴ J. Weber, M. Mandala, M. Del Vecchio, et al., Adjuvant nivolumab versus ipilimumab in resected stage III or IV melanoma, *N. Engl. J. Med.* 377 (19) (2017) 1824–1835.
- ³⁵ H. Davies, G.R. Bignell, C. Cox, et al., Mutations of the BRAF gene in human cancer, *Nature* 417 (2002) 949.
- ³⁶ C. Robert, J.J. Grob, D. Stroyakovskiy, et al., Five-year outcomes with dabrafenib plus trametinib in metastatic melanoma, *N. Engl. J. Med.* (2019), <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1904059>.
- ³⁷ King, A. J., Arnone, M. R., Bleam, M. R., Moss, K. G., Yang, J., Fedorowicz, K. E., et al. (2013). Dabrafenib; preclinical characterization, increased efficacy when combined with trametinib, while BRAF/MEK tool combination reduced skin lesions. *PLoS One* 8:e67583. doi: 10.1371/journal.pone.0067583
- ³⁸ Long, G. V., Weber, J. S., Infante, J. R., Kim, K. B., Daud, A., Gonzalez, R., et al. (2016). Overall Survival and Durable Responses in Patients With BRAF V600-Mutant Metastatic Melanoma Receiving Dabrafenib Combined With Trametinib. *J. Clin. Oncol.* 34, 871–878. doi: 10.1200/JCO.2015.62.9345
- ³⁹ Long, G. V., Flaherty, K. T., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Levchenko, E., de Braud, F., et al. (2017a). Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib

monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Ann. Oncol.* 28, 1631–1639. doi: 10.1093/annonc/mdx176

⁴⁰ Larkin, J., Ascierto, P. A., Dréno, B., Atkinson, V., Liskay, G., Maio, M., et al. (2014). Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N. Engl. J. Med.* 371, 1867–1876. doi: 10.1056/NEJMoa1408868

⁴¹ Ascierto, P. A., Dummer, R., Gogas, H. J., Flaherty, K. T., Arance, A., Mandala, M., et al. (2020). Update on tolerability and overall survival in COLUMBUS: landmark analysis of a randomised phase 3 trial of encorafenib plus binimetinib vs vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF V600-mutant melanoma. *Eur. J. Cancer* 126, 33–44. doi: 10.1016/j.ejca.2019.11.016

⁴² Berrino E, Balsamo A, Pisacane A, et al. High BRAF variant allele frequencies are associated with distinct pathological features and responsiveness to target therapy in melanoma patients. *ESMO Open.* 2021; 6(3): 100133.

⁴³ Stagni C, Zamuner C, Elefanti L, et al. BRAF gene copy number and mutant allele frequency correlate with time to progression in metastatic melanoma patients treated with MAPK inhibitors. *Mol Cancer Ther.* 2018; 17(6): 1332-40

⁴⁴ Mandalà, Mario, et al. «*BRAFV600 Variant Allele Frequency Predicts Outcome in Metastatic Melanoma Patients Treated with BRAF and MEK Inhibitors*». *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, giugno 2023, p. jdv.19281.

⁴⁵ Lebbe C, How-Kit A, Battistella M, et al. BRAF(V600) mutation levels predict response to vemurafenib in metastatic melanoma. *Melanoma Res.* 2014; 24(4): 415-18.

⁴⁶ Johnson, Douglas B., et al. «Impact of NRAS Mutations for Patients with Advanced Melanoma Treated with Immune Therapies». *Cancer Immunology Research*, vol. 3, fasc. 3, marzo 2015, pp. 288–95.

⁴⁷ Hélias-Rodzewicz, Zofia, et al. «Variation of Mutant Allele Frequency in NRAS Q61 Mutated Melanomas». *BMC Dermatology*, vol. 17, fasc. 1, dicembre 2017, p. 9.

⁴⁹ Soria, Xavier, et al. «BRAFV600E Mutant Allele Frequency (MAF) Influences Melanoma Clinicopathologic Characteristics». *Cancers*, vol. 13, fasc. 20, ottobre 2021, p. 5073. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3390/cancers13205073>.