**XI GIORNATA DI DERMATOPATOLOGIA**
**FIRENZE**
**Nuovo Ingresso Careggi**
**Padiglione 3 Didattica Aula 7**
**Sabato 30 marzo 2019**

# CLINICA, ISTOLOGIA GENOMICA: VERSO UNA CLASSIFICAZIONE INTEGRATA DELLE NEOPLASIE MELANOCITICHE

**C. URSO**
*Centro Studi Dermatopatologia di Firenze*

Per i nuovi orizzonti diagnostici e terapeutici che ha aperto in campo oncologico, l'avvento della genomica negli anni 2000 può essere paragonato a quello dell'istologia agli inizi del 1900. Per orientarsi in questi nuovi scenari, come allora fu indispensabile acquisire i concetti base dell'istopatologia, è oggi indispensabile per lo studio dei tumori richiamare alcune semplici nozioni genetiche di base. Una *mutazione* è una modifica del materiale genetico. Una *mutazione genica* è una modifica della sequenza nucleotidica del DNA costituente i cromosomi; questa può avvenire per *sostituzione*, *delezione*, *inserzione* o *duplicazione* di una o più basi. Una *mutazione cromosomica* è una modificazione strutturale, che porta ad un nuovo assetto del cromosoma (*riarrangiamento*); questo può avvenire per *delezione*, *duplicazione*, *inversione* o *translocazione* di un dato segmento cromosomico. Nel conseguente riarrangiamento può accadere che due geni, normalmente distinti, si possano fondere, dando luogo ad un nuovo *gene di fusione*. Inoltre si possono osservare aumenti (*gain*) o perdite (*loss*) del numero di copie di un determinato gene. Ogni modifica nell'assetto genetico può portare ad una modificata sintesi di proteine, che, se attive nei complessi meccanismi di segnalazione e di regolazione del ciclo cellulare, portano ad una modifica dei processi di crescita, differenziazione, proliferazione e sopravvivenza cellulare, come avviene nel processo neoplastico.

In molti melanomi è identificata una mutazione BRAF, riscontrata anche in molti nevi [1-2]. Con una certa frequenza in certi tipi di melanoma e in certi nevi congeniti è osservata una mutazione NRAS [3-4]. In una frazione di nevi di Spitz è rinvenuta invece una mutazione HRAS [5]. NRAS e HRAS, come BRAF, sono mutazioni attivanti la via di segnalazione MAPK. Inoltre, nei nevi blu, nel nevo blu maligno e nel melanoma uveale sono identificate mutazioni GNAQ e GNA11, codificanti una proteina attiva nella stessa via di segnalazione [6-7]. In certe neoplasie di aspetto spitzoide e in alcuni melanomi è trovata, accanto ad una mutazione BRAF, una mutazione inattivante il gene soppressore tumorale BAP1 [8-9]. Inoltre, nei melanomi insorgenti su cute fotoesposta sono riscontrabili mutazioni NF1, NRAS e particolari varianti di BRAF (non-V660E), tutte attivanti la via di segnalazione MAPK [10]. Molto frequente risulta inoltre la presenza di mutazione NF1 anche nei melanomi desmoplastici [11]. I melanomi acrali mostrano molte mutazioni, fra cui una mutazione KIT, attivante le vie di segnalazione MAPK, PI3K e STAT3, rinvenuta anche in una frazione di nevi acrali [12-13]. Nei tumori spitzoidi sono invece riscontrate alcune translocazioni con formazione di geni di fusione, coinvolgenti geni codificanti diverse chinasi: ALK, ROS1, MET, RET, BRAF, NTRK1, NTRK3, MAP3K8, attivanti la solita via MAPK [14-17]. I nevi penetranti mostrano la mutazione CTNNB1 associata a mutazioni BRAF, HRAS o MAP2K, attivante la via di segnalazione beta-catenina/WNT [18]. Una mutazione PRKAR1A e una fusione PRKCA vengono riscontrate in lesioni iperpigmentate come il melanocitoma epitelioide pigmentato e il melanoma di tipo animale [19-20]. Nei vari tipi di melanoma, inoltre, molto elevato appare il numero di mutazioni che riguardano geni soppressori tumorali e geni attivanti in vario modo, il ciclo proliferativo, inclusi CDKN2A, PTEN, CDK-4, TP53 e TERT-p [21-22].

| MUTAZIONI NELLE NEOPLASIE MELANOCITICHE | |
|---|---|
| • Mutazione BRAF<br>• Mutazione NRAS<br>• Mutazione HRAS<br>• Mutazione GNAQ<br>• Mutazione GNA11<br>• Mutazione BAP1<br>• Mutazione NF1<br>• Mutazione KIT<br>• Fusioni ALK, ROS1, NTRK1, NTRK3, RET, MET, BRAF, MAP3K8<br>• Mutazione CTNNB1 | •Mutazione PRKAR1A<br>•Fusione PRKCA<br>•Mutazione CDKN2A<br>•Mutazione PTEN<br>•Mutazione CDK4<br>•Mutazione TP53<br>•Mutazione TERT-p<br>•Altre mutazioni abolenti ulteriori meccanisni di soppressione tumorale e attivanti ulteriori vie oncogeniche (…) |

**Fig. 1: Mutazioni nelle neoplasie melanocitiche**

Il quadro risultante dalla somma di tutte queste aberrazioni genetiche nel melanoma e nelle neoplasie melanocitiche benigne appare complesso (Fig. 1), difficile da interpretare e con molteplici implicazioni per la terapia e la diagnosi oncologica. In terapia, la conoscenza dell'assetto mutazionale ha dato luogo alla ricerca di farmaci specifici che usano come *target* precise mutazioni genetiche. E' questo il caso della mutazione BRAF V600E, bersaglio del *vemurafenib*. Su questo modello altre molecole possono essere utilizzate verso altre mutazioni specifiche con potenziale vantaggio dei pazienti con melanoma metastatico. Un po' meno vantaggio ha tratto invece finora la diagnosi. La tecnica FISH esplora alcuni loci cromosomici alterati del melanoma, fra cui RREB1,

CCND1, MYB, CEP6, CDKN2A, traendo informazioni che possono essere di ausilio nella diagnosi [23]. L'immunoistochimica può essere impiegata con qualche vantaggio per la determinazione di alterazioni genetiche, come BRAF (VE1), BAP1 e beta-catenina.

Dallo studio genetico, però, oltre a questi importanti risultati, si possono ricavare altri dati utili sul piano della classificazione e quindi della diagnosi delle neoplasie melanocitiche. Dall'analisi dei risultati, infatti, emergono alcuni dati: 1) mutazioni sono presenti sia nei nevi che nei melanomi; 2) i nevi presentano una singola mutazione o poche mutazioni; i melanomi presentano un alto numero di mutazioni; 3) alcune mutazioni sono condivise da nevi e melanomi; altre non sono condivise, essendo riscontrabili solo nei melanomi; 4) le mutazioni condivise sono mutuamente esclusive (se c'è una, non c'è l'altra); le mutazioni non condivise sono cumulative (si sommano); 5) le mutazioni condivise sono diverse nei diversi istotipi di nevo e di melanoma; le mutazioni non condivise sono uguali nei vari istotipi di melanoma; 6) le mutazioni condivise sono meno recenti nell'oncogenesi e conferiscono alla neoplasia specifiche caratteristiche morfo-biologiche (mutazioni driver); le mutazioni non condivise sono più recenti nell'oncogenesi e conferiscono proprietà connesse alla malignità, come invasione locale e metastasi (mutazioni promoter). A fronte di queste considerazioni, lo schema classificativo classico nevo-melanoma appare un po' troppo semplice e anche un po' anacronistico. Il polimorfismo clinico e istologico dei nevi e dei melanomi, a lungo declassato a mera fluttuazione morfologica senza significato biologico, emerge invece come il risultato preciso della somma di specifiche aberrazioni genetiche. Le categorie diagnostiche "nevo" e "melanoma" appaiono di conseguenza sempre di più come due grandi agglomerati di neoplasie eterogenee dal punto di vista genetico, clinico, e istologico. Invece, tenendo conto delle mutazioni driver, condivise da nevi e melanomi, è possibile, ancora con qualche difficoltà e lacune, individuare alcune vie patologiche [24] o *classi* di neoplasie omogenee [25] geneticamente, clinicamente e istologicamente (Fig. 2). Queste differenti classi di neoplasie possono e dovrebbero essere diagnosticate con criteri istologici specifici, piuttosto che con una singola lista di criteri generici per una generica differenziazione nevo-melanoma: occorre una chiave specifica per ciascuna porta; non si può usare la stessa chiave per tutte le serrature [25]. Questa maggior consapevolezza di complessità, può attenuare probabilmente alcune difficoltà nella diagnosi delle neoplasie melanocitiche, ma appare insufficiente se si considera che in ogni classe esistono forme ambigue, correntemente etichettate come "neoplasie borderline", che non raramente costituiscono un rompicapo diagnostico e prognostico. Anche su queste neoplasie, tuttavia, l'analisi genetica può gettare forse un po' di luce. Le neoplasie borderline, infatti, sembrano mostrare più mutazioni dei "nevi" e meno mutazioni dei "melanomi" [24]; ovvero, più specificamente, mostrano le stesse mutazioni driver, ma un numero minore di mutazioni promoter rispetto ai "melanomi". In sintesi, quindi, "nevo", "neoplasia borderline" e "melanoma", in ciascuna classe, differiscono per il numero di mutazioni promoter: zero nel "nevo", poche nella "neoplasia borderline" e molte nel "melanoma". Pertanto, le "neoplasie borderline" in ciascuna classe possono essere interpretate come forme neoplastiche in progressione tra il "nevo" (solo mutazioni driver) e il "melanoma" (mutazioni driver più alto numero di mutazioni promoter). Ma, se è così, "nevo", "neoplasia borderline" e "melanoma", piuttosto che tre neoplasie diverse, appaiono più propriamente come tre successivi *stati genetici* dello stesso processo neoplastico e, quindi, della stessa neoplasia [26]. Stati successivi, individuati arbitrariamente e spesso con difficoltà segregati, in una realtà che contiene un insieme di stati genetici con variabile accumulo di mutazioni. Il carico mutazionale complessivo conferisce a una data neoplasia in un dato paziente un certo rischio che si verifichino eventi avversi (recidiva locale, metastasi loco-regionale, metastasi a distanza, morte); tale rischio rappresenta il *potenziale di malignità* di quella neoplasia. Il potenziale di malignità potrebbe e dovrebbe essere stimato oggettivamente in ciascuna neoplasia, valutando il numero di mutazioni, il peso di ciascuna e il peso del loro eventuale sinergismo. Purtroppo, non essendo questo ancora possibile, al momento una stima del potenziale di malignità può essere tentata tramite parametri istologici a valenza prognostica [27-28].

CLASSIFICAZIONE INTEGRATA DELLE NEOPLASIE MELANOCITICHE

| MUTAZIONI DRIVER | NEVI | MELANOMI |
|---|---|---|
| BRAF | NEVI COMUNI, PICCOLI CONGENITI | MELANOMI LOW- CSD (SSM) |
| RAS | MEDI CONGENITI | MELANOMI LOW CSD |
| NF1, NRAS, BRAF | | MELANOMI HIGH CSD, |
| NF1 | | MELANOMI DESMOPLASTICI |
| KIT, NRAS, BRAF | NEVI ACRALI | MELANOMI ACRALI |
| KIT, NRAS, KRAS | | MELANOMI MUCOSI |
| GNAQ, GNA11 | NEVI BLU | NEVI BLU MALIGNI |
| BRAF+BAP1 | BAPOMA (NEVO BAP1-) | BAPOMA MALIGNO (MELANOMA BAP1-) |
| BRAF + PRKCA, PRKAR1A | NEVI BLU EPITELIOIDI | MELANOMI DI TIPO ANIMALE |
| BRAF, MAP2K, HRAS + CTNNB1 | NEVO PENETRANTE | MELANOMI DPN-LIKE |
| ALK, ROS1, NTRK1, NTRK3, MET, RET, BRAF, MAP3K8 | NEVI DI SPITZ | MELANOMI SPITZOIDI |

**Fig. 2: Classificazione integrata delle neoplasie melanocitiche**

Bibliografia


1. Davies H, Bignell GR, Cox C *et al*. Mutation of BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-954.
2. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. Nat Genet 2003; 33: 19–20.

3. van't Veer LJ, Burgering BMT, Vesteeg R, et al. N-*ras* mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites. Mol Cell Biol 1989; 9: 3114-3116.
4. Bauer J, Curtin JA, Pinkel D, et al. Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations. J Invest Dermatol 2007; 127: 179–182.
5. van Engen-van Grunsven ACH, van Dijk MC, Ruiter DJ, et al. HRAS-mutated Spitz tumors: a subtype of Spitz tumors with distinct features. Am J Surg Pathol 2010; 34: 1436–1441.
6. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. Nature 2009;457: 599–602.
7. Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, et al. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. N Engl J Med 2010; 363: 2191–2199.
8. Wiesner T, Murali R, Fried I, et al. A distinct subset of atypical Spitz tumors is characterized by BRAF mutation and loss of BAP1 expression. Am J Surg Pathol 2012; 36: 818–830.
9. Aung PP, Nagarajan P, Tetzlaff MT, et al. Melanoma with loss of BAP1 in patients with no family history of BAP1-associated cancer susceptibility syndrome: a case series. Am J Dermatopathol 2019; 41: 167-179.
10. Krauthammer M, Kong Y, Bacchiocchi A, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. Nat Genet 2015; 47: 996-1002.
11. Wiesner T, Kiuru M, Scott Sn, et al. NF1 mutations are common in desmoplastic melanoma. Am J Surg Pathol 2015; 39; 1357-1362.
12. Curtis JA, Busam K, Pinkel D, et al. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. J Clin Oncol 2006; 24: 4340-4346.
13. Moon KR, Chooi YD, Kim JM, et al. Genetic alterations in primary acral melanoma and acral melanocytic nevus in Korea: common mutated genes show distinct cytomorphological features. J Invest Dermatol 2018; 138: 933-945.
14. Wiesner T, He J, Yelensky R, et al. Kinase fusions are frequent in Spitz tumours and spitzoid melanomas. Nat Commun 2014; 5: 3116.
15. Yeh I, Botton T, Talevich E, et al. Activating MET kinase rear-rangements in melanoma and Spitz tumours. Nat Commun 2015; 6: 7174.
16. Yeh I, Tee MG, Botton T, et al. NTRK3 kinase fusions in Spitz tumours J Pathol 2016; 240: 282-290.
17. Newman S, Fan L, Pribnow A, et al. Clinical genome sequencing uncovers potentially targetable truncations and fusions of MAP3K8 in spitzoid and other melanomas. Nat Med 2019 Mar 4. doi: 10.1038/s41591-019-0373-y Epub ahead of print.
18. Yeh I, Lang UE, Durieux E, et al. Combined activation of MAP kinase pathway and b-catenin signaling cause deep penetrating nevi. Nat Commun. 2017; 8: 644.
19. Zembowicz A, Knoepp SM, Bei T, et al. Loss of expression of protein kinase A regulatory subunit 1a in pigmented epithelioid melanocytoma but not in melanoma or other melanocytic lesions. Am J Surg Pathol. 2007; 31: 1764–1775.
20. Bahrami A, Lee S, Wu G, et al. Pigment-synthesizing melanocytic neoplasm with protein kinase C alpha (PRKCA) fusion. JAMA Dermatol. 2016; 152: 318–322.
21. Potrony M, Badenas C, Aguilera P, et al. Update in genetic susceptibility in melanoma. Ann Transl Med. 2015; 3: 210.
22. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, et al. Science 2013; 339: 957-959.
23. Gerami P, Li G, Puryazdanparast P, et al. A highly specific and discriminatory FISH assay for distinguishing between benign and malignant melanocytic neoplasms. Am J Surg Pathol 2012; 36: 808-817.
24. Bastian BC, de la Fouchardiere A, Elder DE, et al. Genomic landscape of melanoma. In: Elder DE, Massi D, Scolyer RA, et al, eds. WHO Classification of Skin Tumours. 4th ed. 2018:72–75
25. Urso C. Melanocytic lesions, Spitz tumors, and Don Ferrante's logic. Am J Dermatopathol 2007; 29: 491-494.
26. Urso C. Melanocytic skin neoplasms: what lesson from genomic aberrations? Am J Dermatopathol, in press.
27. Urso C. Time to reconsider Spitzoid neoplasms? *Dermatol Pract Concept* 2016; 6 (2): 8.
28. Urso C. If cellular blue melanocytic lesions do not form a spectrum…*Am J Dermatopathol* 2017; 39: 711-713.