



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

**Università degli studi di Roma “Sapienza”
I Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche
U.O.C Clinica Dermatologica**

**Dottorato di Ricerca in TECNOLOGIE INNOVATIVE NELLE MALATTIE DELLO
SCHELETRO, DELLA CUTE E DEL DISTRETTO ORO -CRANIO-FACCIALE**

**Analisi dei principali marcatori molecolari espressi dai pazienti affetti da melanoma e
possibili correlazioni clinico-patologiche**

Relatore

Prof. S. Calvieri

Dottoranda

Dott.ssa P. Corsetti

INTRODUZIONE.....	5
IL MELANOMA	7
Fattori di rischio	7
FATTORI AMBIENTALI.....	7
Esposizione al sole e scottature.....	7
FATTORI INDIVIDUALI.....	10
Nevo comune e nevo atipico	10
Caratteristiche fenotipiche	12
Esposizione a radiazione UV, lampade e lettini per l'abbronzatura.....	15
Uso di creme solari protettive	18
Uso di contraccettivi orali	20
Terapia ormonale sostitutiva in menopausa.....	21
Melanomi multipli.....	22
Occupazione.....	23
Prevenzione primaria	25
PATOGENESI.....	28
Vie Genetico-molecolari coinvolte nel melanoma.....	29
NRAS-BRAF	30
PI3K	32
MITF	32
c-KIT	33
Figura 1. Principali pathway coinvolti nella patogenesi del melanoma	35
.....	35
DIAGNOSI	36
DIAGNOSI CLINICA	36
Figura 2. Regola dell'ABCDE	38
.....	38
DIAGNOSI STRUMENTALE	39
Diagnosi Dermoscopica	39
Videodermatoscopia computerizzata	39
Microscopia laser confocale (RCM, "Reflectance Confocal Microscopy").....	39
DIAGNOSI ISTOPATOLOGICA	41
CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE E	42
MOLECOLARI	42
Classificazione clinico-patologica di Clark	44
Caratteristiche clinico-patologiche	46
Melanoma a diffusione superficiale.....	47
Figura 3a	48
Figura 3b	49
Melanoma nodulare (NM)	50

Figura 5b	53
Lentigo maligna - melanoma	53
Figura 5 a. Melanoma su lentigo maligna.....	53
Melanoma acrale-lentiginoso	55
Figura 6a	56
Figura 6b	56
Melanoma desmoplastico.....	57
Melanoma su nevo congenito gigante.....	57
Melanoma nevoide.....	57
Istotipi rari.....	58
Classificazione molecolare	60
Tabella 1. Principali mutazioni somatiche nel melanoma avanzato	63
STADIAZIONE	64
Tab.2 Stadiazione TNM (AJCC)	65
FATTORI PROGNOSTICI	67
Figura 7	69
FOLLOW UP.....	73
TRATTAMENTO CHIRURGICO.....	74
Tabella 4.....	75
METASTASI IN TRANSITO	76
TRATTAMENTO MEDICO.....	79
CHEMIOTERAPIA	79
IMMUNOTERAPIA.....	82
Immunoterapia adiuvante.....	82
Anticorpi immunomodulanti.....	83
Figura 8	85
.....	85
TARGET THERAPY	86
CLASSIFICAZIONE MOLECOLARE DEL MELANOMA	86
COME PRINCIPIO BASE PER TERAPIE PERSONALIZZATE E TARGET.....	86
Figura 9	89
Valutazione di nuovi fattori prognostici	90
Biosintesi Vitamina D.....	91
Attività biologica.....	92
Livelli di Vitamina D	94
Esposizione solare e melanoma	96
Fattori che influenzano la produzione di Vitamina D.....	97
Vitamina D e neoplasie	99
Studi osservazionali sui livelli di Vitamina D e melanoma	100
Recettore della Vitamina D.....	101

VDR e gene p53	102
MATERIALI E METODI.....	104
Analisi retrospettiva	105
Analisi dei livelli sierici di vitamina D	106
Analisi statistica	107
RISULTATI.....	108
Melanoma NST-MM e ST-MM.....	108
Analisi dei livelli sierologici di vitamina D.....	111
DISCUSSIONE.....	114
BIBLIOGRAFIA	119

INTRODUZIONE

Il melanoma è una delle forme più aggressive di neoplasie maligne e la sua incidenza è in continuo aumento nella popolazione caucasica. Esso è una complessa ed eterogenea neoplasia, causata da una proliferazione anomala dei melanociti: cellule pigmentate normalmente presenti nell'epidermide, nel derma e nel bulbo pilifero, derivanti dalla cresta neurale.

La cute è la sede elettiva del melanoma, tuttavia può localizzarsi primariamente alle mucose, occhio (uvea, corioide e congiuntiva) e meningi.

Nel mondo, esso è al 16° posto tra i tumori più frequenti negli uomini e al 18° posto nelle donne. Rappresenta per incidenza l'1,5 % del totale dei tumori negli uomini e l'1,6 % nelle donne, con circa 102.000 nuovi casi/anno (26.000 morti/anno) e 98.000 nuovi casi/anno (21.000 morti/anno), rispettivamente negli uomini e nelle donne ¹.

Negli ultimi 40 anni, l'incidenza del melanoma è aumentata, soprattutto tra la popolazione di razza bianca. Negli Stati Uniti, l'incidenza del melanoma è passata da 6 casi per 100.000 abitanti all'inizio del 1970 a 18 casi per 100.000 abitanti all'inizio del 2000, mostrando un incremento del tasso di incidenza di 3 volte. Nello stesso periodo, nei Paesi dell'Europa centrale, i tassi di incidenza sono passati da 3-4 casi per 100.000 a 10-15 casi per 100.000 abitanti, mostrando incrementi analoghi agli Stati Uniti. Inoltre, lo studio dei trend d'incidenza indica che nei Paesi occidentali i tassi continueranno ad aumentare anche nelle prossime due decadi. Viceversa, i tassi di mortalità si sono stabilizzati in alcuni Paesi, a partire dagli anni '90, indicando, probabilmente, un miglioramento nella diagnosi precoce ².

Per quanto riguarda la sopravvivenza, un recente lavoro, che ha utilizzato i dati dei Registri Tumori di 18 Paesi europei (EUROCARE-4) relativi al periodo dal 1988 al 1999, ha evidenziato che la sopravvivenza a 5 anni del melanoma è aumentata, passando dal 78% all'83%³. Nonostante il melanoma rappresenti il 2-3% del totale dei tumori (esclusa cute non melanoma), risulta ai primi posti in termini di frequenza nei soggetti di età < 50 anni, tra i quali rappresenta l'8-10% del totale in entrambi i sessi⁴.

Il numero medio annuo di casi di melanoma registrati nell'area coperta dai Registri Tumori è stato di 14,3 casi per 100.000 uomini e di 12,6 per 100.000 donne. L'analisi dei trend di incidenza, espressi come stima annuale del cambiamento percentuale del tasso standardizzato APC ("Annual Percentage Change"), ha mostrato un significativo aumento negli uomini (APC: + 3,8) e nelle donne (APC: + 1,9). Tra gli uomini, anche la mortalità è in significativa crescita (APC: + 2,6).

La mortalità per melanoma tra gli uomini è l'unica in aumento assieme a quella per il polmone tra le donne. L'incidenza è simile fra Nord e Centro ed inferiore nel Meridione, mentre la mortalità appare più omogenea⁵.

Al 1 Gennaio 2006, l'analisi dei dati di prevalenza ha mostrato circa 81.000 persone viventi (34.000 uomini e 47.000 donne) che avevano avuto una diagnosi di melanoma nel corso della loro vita. Di queste, circa il 40% ha avuto una diagnosi di melanoma negli ultimi 5 anni rispetto al Gennaio 2006⁶. Recenti dati mostrano una sopravvivenza relativa a 5 anni dalla diagnosi dell'81% negli uomini e dell'88% nelle donne, con un gradiente alla riduzione sia all'aumentare dell'età, sia geografico, da Nord a Sud Italia⁷.

IL MELANOMA

Fattori di rischio

I fattori di rischio per lo sviluppo del melanoma maligno (MM) vengono suddivisi in ambientali ed individuali.

FATTORI AMBIENTALI

Esposizione al sole e scottature

Fin dagli anni '80, l'esposizione al sole è stata identificata in molti studi epidemiologici come la principale causa ambientale di melanoma, nonostante questa relazione sia tuttora dibattuta ^{29, 30}.

In particolare, è stata riportata un'associazione positiva diretta con l'esposizione intermittente al sole durante il tempo libero ^{31, 32}.

L'accumulo di evidenze scientifiche ha portato nel 1991 ad una prima "Consensus Conference" sui danni da radiazioni solari ³³, nella quale i componenti della Commissione hanno concordato che l'esposizione alla luce solare è il solo fattore esogeno causale per il melanoma nelle popolazioni di razza bianca.

L'anno successivo, 1992, un altro gruppo di ricercatori, riunitosi presso l'International Agency for Research on Cancer (IARC) di Lione, dopo aver rivisto con grande dettaglio i lavori scientifici pubblicati sull'associazione tra melanoma ed esposizione al sole, ha concluso che l'esposizione solare è la principale causa del melanoma nell'uomo ³⁴. D'interesse, il ruolo della luce UV come fattore induttore nella genesi del melanoma in età infantile, che è stato convalidato anche in un modello murino ³⁵.

Sono stati pubblicati 2 studi di meta-analisi^{36,37} ed uno studio di pooled analysis sull'argomento³⁸. Lo studio di Gandini et al.³⁶ ha analizzato i risultati di 57 lavori internazionali pubblicati nel periodo 1969-2002 (50 studi caso-controllo, 5 studi di coorte e 2 nested caso-controllo).

Gli Autori hanno calcolato un rischio relativo pool (RR) per il melanoma di 1,34 (95% intervallo di confidenza - CI: 1,02 -1,77) nei soggetti esposti a radiazioni UV rispetto ai non-esposti.

Inoltre, gli Autori hanno classificato l'esposizione solare in: intermittente (solo come attività sportive all'aria aperta, sport acquatici e vacanze in posti soleggiati), continua (solo esposizione occupazionale) e totale (sia intermittente sia continua). Questo rischio, in confronto ai non-esposti, era significativamente più elevato nei soggetti con un'esposizione intermittente (RR=1,61; 95% CI: 1,31-1,99) rispetto ai soggetti con un'esposizione continua (RR=0,98).

I soggetti con una storia di scottature avevano un rischio circa 2 volte più elevato (RR=2,03; 95% CI: 1,73-2,37) rispetto a quelli che non ne avevano subite. Inoltre, il rischio era più elevato quando gli episodi di scottature erano avvenuti nell'infanzia rispetto all'età adulta³⁶.

Lo studio di Dennis et al.³⁷ ha analizzato 51 lavori internazionali, pubblicati nel periodo 1985-2002, valutando il rischio di melanoma rispetto alla storia di scottature ed all'esposizione solare durante tutta la vita dei soggetti. Gli Autori hanno trovato che il rischio di melanoma per le scottature in specifici periodi della vita era leggermente più

elevato se queste erano avvenute nell'infanzia (OR: 1,9; 95% CI: 1,6-2,3) e nell'adolescenza (OR=1,6; 95% CI: 1,4-1,9) rispetto all'età adulta (OR=1,4; 95% CI: 1,3-1,6).

Il rischio calcolato su tutto il periodo della vita era 1,6 (95% CI:1,4-1,8), rischio che è coerente con quelli osservati nei singoli periodi della vita. In 26 lavori, tra quelli identificati, è stato possibile calcolare il rischio di melanoma per il numero di scottature (cl clinicamente rilevanti), avvenute nel corso della vita dei soggetti.

Gli Autori hanno calcolato che per incrementi di 5 scottature avvenute nei vari periodi della vita, i rischi erano 1,4 nell'infanzia, 1,4 nell'adolescenza e 1,5 nell'età adulta, confermando che sia la scottatura in sé, sia il numero di scottature avvenute nel corso della vita rappresentano un importante fattore di rischio per il melanoma.

Lo studio di Chang et al.³⁸ ha analizzato l'associazione tra rischio di melanoma ed esposizione solare a diverse latitudini, durante il tempo libero e durante il lavoro. La pooled analysis è stata fatta considerando 15 studi caso-controllo pubblicati nel periodo 1994-2006 (5.700 casi di melanoma e 7.216 controlli). Gli Autori hanno evidenziato che l'esposizione durante il tempo libero, stratificata per latitudine di residenza dei soggetti, era un fattore di rischio di melanoma per il tronco (OR=1,7; 95% CI: 1,4- 2,2) e per gli arti (OR=1,4; 95% CI: 1,1-1,7), ma non per il capo-collo (OR=1,1; 95% CI: 0,8-1,4).

L'esposizione solare durante il lavoro era associata con il rischio di melanoma per il capo-collo nelle aree a bassa latitudine (OR=1,7; 95% CI: 1,0-3,0). Il rischio associato alle scottature nell'infanzia era 1,5 (95% CI: 1,3-1,7), 1,5 (95% CI: 1,3-1,7) e 1,4 (95% CI: 1,1-1,7), rispettivamente per il melanoma del tronco, degli arti e della regione capo-

collo, mostrando solo piccole differenze per le diverse latitudini. Lo studio ha evidenziato che il rischio di melanoma in differenti parti del corpo è associato con differenti modelli di esposizione. L'esposizione solare durante il tempo libero è un forte indicatore di rischio di melanoma a tutte le latitudini, mentre l'esposizione durante il lavoro e l'esposizione totale appaiono indicatori di rischio di melanoma, soprattutto a basse latitudini.

In conclusione, i risultati della letteratura mostrano che vi è una associazione positiva tra esposizione ai raggi solari e rischio di melanoma e che il rischio è elevato a tutte le età. Inoltre, il rischio aumenta con il numero di scottature avvenute nel corso della vita.

FATTORI INDIVIDUALI

Nevo comune e nevo atipico

I risultati della letteratura scientifica hanno suggerito che, per le popolazioni di origine caucasica, il numero di nevi melanocitari rappresenta un valido indicatore di rischio per il melanoma e che i nevi atipici possono avere un ruolo indipendente^{39, 40}.

Inoltre, il rischio di melanoma è basso nei soggetti con pochi nevi comuni, mentre è più elevato nei soggetti con nevi multipli e nevi atipici⁴¹.

Recentemente, sono stati pubblicati 2 lavori di meta-analisi^{42, 43}.

Lo studio di Gandini et al.⁴⁴ ha analizzato i risultati di 46 lavori internazionali pubblicati nel periodo 1969-2002 (36 studi caso-controllo, 8 studi di coorte e 2 studi nested).

Gli Autori hanno confermato che il numero di nevi comuni è un importante fattore di rischio, con un incremento di rischio associato alla presenza di un numero > 100 nevi in confronto ad un numero < 15 nevi (RR=6,89; 95% CI: 4,63-10,25) e al numero di nevi atipici (RR=6,36; 95% CI: 3,80-10,33 per ≥ 5 verso zero). Lo studio di Olsen et al.⁴⁵, in particolare, ha analizzato l'associazione tra rischio di melanoma e tipo di nevi, calcolando la frazione di rischio attribuibile (PAF, "Population Attributable Fraction"), cioè la proporzione di casi di melanoma nella popolazione attribuibile alla presenza dei singoli fattori di rischio.

In questa meta-analisi sono stati valutati 49 studi, pubblicati nel periodo 1980-2008, di cui 25 sui nevi atipici e 23 sui nevi comuni. Gli Autori hanno trovato che per i soggetti con ≥ 1 nevo atipico il rischio relativo di melanoma era 3,63 (95% CI: 2,85-4,62), con un PAF del 25% ed inoltre, che il 4%, il 7%, il 15% ed il 25% dei melanomi era attribuibile (PAF) ai soggetti con un numero di nevi comuni rispettivamente ≤ 10 , 11-24, 25-49 e ≥ 50 . In conclusione, i risultati della letteratura mostrano che il numero dei nevi comuni, dei nevi atipici e dei nevi multipli è un importante fattore di rischio per il melanoma.

E' opportuno sottolineare che il termine di nevo atipico è considerato un sinonimo di nevo clinicamente displastico e che non esiste una correlazione stringente tra nevo clinicamente displastico e nevo istologicamente displastico (displasia dimostrata all'esame istopatologico). I principali criteri cito-architetturali che consentono di porre diagnosi di nevo istologicamente displastico sono: estensione laterale della componente giunzionale oltre la componente dermica (estensione laterale o "spalla"), nidi di

melanociti giunzionali irregolarmente orientati (proliferazione a nidi disordinati), iperplasia epidermica lentiginosa, atipia citologica discontinua (random), fibroplasia ed infiltrato linfocitario dermico. Ad oggi, non è dimostrato che il nevo displastico istologicamente determinato rappresenti un precursore morfologico del melanoma.

Recentemente, sono stati pubblicati 2 studi di meta-analisi ^{46,47}, che hanno confermato questi risultati.

Nella meta-analisi di Peto e Houlston (2001) ⁴⁶ si è confermata un'associazione positiva tra rischio di melanoma e familiarità per melanoma (RR=2,5). A simile conclusione è giunta la successiva meta-analisi di Gandini et al. ⁴⁷, in cui gli Autori hanno analizzato i risultati di 60 lavori internazionali pubblicati nel periodo 1969-2002 (57 studi caso-controllo, 2 studi di coorte ed 1 studio nested): gli Autori hanno confermato che i soggetti con familiarità positiva per melanoma hanno un rischio pool di melanoma di 1,74 (95% CI: 1,41-2,14) in confronto a quelli senza familiarità. In conclusione, i risultati della letteratura hanno evidenziato come i soggetti con una storia familiare positiva per melanoma hanno un rischio circa 2 volte più elevato di sviluppare un melanoma rispetto a soggetti senza familiarità.

Caratteristiche fenotipiche

Tra gli studi epidemiologici pubblicati (1984-2004), molti hanno valutato l'associazione tra rischio di melanoma e caratteristiche fenotipiche della popolazione (ad esempio, densità delle lentiggini, colore degli occhi, dei capelli e della pelle). La maggior parte di questi studi ha mostrato un rischio elevato di melanoma nei soggetti con alta

densità di lentiggini (rischi tra 1,7 e 6,9) verso bassa densità; occhi chiari/grigi (rischi tra 1,1 e 3,8) e occhi blu (rischi tra 1,0 e 4,5) verso occhi neri; capelli rossi (rischi tra 1,2 e 7,8) e biondi (rischi tra 1,1 e 4,9) verso capelli neri; pelle chiara (rischi tra 1,6 e 9,0) verso pelle scura. La variabilità del rischio di melanoma, e soprattutto alcuni risultati discordanti, sono probabilmente dovuti ad un aggiustamento non appropriato dei rischi per tutti quei fattori di confondimento noti (ad esempio, razza, durata di esposizione solare, varie caratteristiche fenotipiche, fototipo e familiarità per melanoma).

Recentemente, sono stati pubblicati 2 studi di meta-analisi ^{47, 48}.

Lo studio di Gandini et al.⁴⁷ ha analizzato i dati di 60 lavori internazionali pubblicati nel periodo 1969-2002. Gli Autori hanno evidenziato che i soggetti con un'alta densità di lentiggini hanno un rischio di melanoma 2 volte più grande in confronto a quelli senza lentiggini o con lentiggini diradate (RR=2,10; 95% CI: 1,80-2,45).

I soggetti con fototipo di Fitzpatrick I verso quelli con fototipo IV hanno un rischio di melanoma di 2.

I soggetti con occhi chiari hanno un rischio di melanoma più alto rispetto a quelli con occhi neri (RR=1,62; 95% CI: 1,44-1,81).

In confronto ai soggetti con capelli neri, il rischio di melanoma era più elevato nei soggetti con capelli rossi (RR=3,64), intermedio nei soggetti con capelli biondi (RR=1,61) e basso nei soggetti con capelli castani (RR=1,52). Infine, il rischio di melanoma nei soggetti con pelle chiara era maggiore in confronto a quelli con pelle scura (RR=2,06; 95% CI: 1,68-2,52).

La meta-analisi di Olsen et al.⁴⁸ ha analizzato i dati di 66 lavori internazionali pubblicati nel periodo 1979-2008 (42 studi caso-controllo ospedalieri; 20 studi caso-controllo di popolazione, 3 studi di coorte e 1 studio nested). Gli Autori hanno calcolato che i rischi pool erano: 2,64 per soggetti con capelli rossi/rosso-biondi, 2,0 per quelli biondi e 1,46 per quelli castano chiaro verso i soggetti con capelli neri. I rischi erano: 1,57 per i soggetti con occhi blu/blu-grigi, 1,51 per quelli con occhi verdi/grigi/nocciola verso quelli con occhi neri.

I rischi erano: 2,27, 1,99 e 1,35 per i soggetti con fototipo cutaneo I, II e III rispettivamente verso quelli con fototipo IV.

Infine, il rischio di melanoma era 1,99 per i soggetti con lentiggini verso quelli senza lentiggini. Inoltre, gli Autori hanno calcolato che il valore di PAF era del 27% per il fototipo I/II, del 23% per la presenza di lentiggini, del 23% per il colore chiaro/biondo dei capelli e del 18% e del 13% per gli occhi blu/blu-grigi e verdi/grigi/nocciola, rispettivamente.

In conclusione, ci sono evidenze scientifiche che i soggetti con cute, occhi e capelli chiari e con fototipo I/II hanno un rischio di melanoma doppio rispetto ai soggetti con cute scura e con occhi, capelli scuri/neri e fototipo IV.

Sebbene lo screening di massa rappresenti il migliore presidio di prevenzione secondaria dei tumori, esso non è proponibile per gli alti costi riferibili alla necessità di esaminare l'intero ambito cutaneo di tutti i soggetti di età superiore ai 16-18 anni. Più proponibile è uno screening selettivo diretto ai soggetti ad alto rischio (ad esempio,

familiarità per melanoma, caratteristiche fenotipiche e portatori di lesioni pigmentate)^{49,50}.

Esposizione a radiazione UV, lampade e lettini per l'abbronzatura

E' noto come l'esposizione intensa ed intermittente alle radiazioni UV solari sia un importante fattore di rischio per il melanoma ³⁶.

Le radiazioni UV hanno una lunghezza d'onda tra 100 e 400 nm e sono classificate in UVA (400-315 nm), UVB (315-280 nm) e UVC (280-100 nm). Le moderne apparecchiature per l'abbronzatura emettono principalmente radiazioni nel range UVA, ma una frazione < 5% di questo spettro è nel range UVB.

Prima del 1992, le radiazioni UVB erano considerate la sola parte cancerogena dello spettro solare, ma da allora anche le radiazioni UVA sono state sospettate di essere un potenziale cancerogeno.

Per questo, nel 1992, la IARC ha classificato le radiazioni UVB e UVA, e "l'uso di lampade e lettini per l'abbronzatura" come "probabili cancerogeni per l'uomo" (Gruppo 2A, della Classificazione IARC degli agenti cancerogeni) ³⁴. Molti studi epidemiologici hanno esaminato l'associazione tra rischio di melanoma e l'uso di lampade e/o lettini per l'abbronzatura.

Questo perché l'utilizzo di queste apparecchiature, che si è andato diffondendo dagli anni '80 in molti Paesi sviluppati, in particolare del Nord Europa e degli Stati Uniti, è una fonte artificiale di radiazioni UV.

Recentemente, sono stati pubblicati 2 studi di meta-analisi ^{49, 50} ed uno studio caso-controllo di popolazione ⁵¹, che hanno analizzato l'associazione tra rischio di melanoma e l'utilizzo di lampade e/o lettini per l'abbronzatura.

Nello studio di Gallagher et al.⁴⁹, gli Autori hanno analizzato i risultati di 10 lavori internazionali pubblicati nel periodo 1984-2004 (9 studi caso-controllo e 1 studio di coorte). Gli Autori hanno calcolato un rischio relativo pool per il melanoma di 1,25 (95% CI: 1,05-1,49) nei soggetti che avevano fatto uso nella loro vita di lampade e/o lettini per l'abbronzatura rispetto a quelli che non ne avevano fatto uso.

Inoltre, il rischio di melanoma era maggiore nei soggetti che si erano esposti per la prima volta in giovane età < 40 anni (RR=1,69; 95% CI:1,32-2,19) e nei soggetti che avevano usato queste apparecchiature molto di frequente o per lunghi periodi (RR=1,61; CI: 1,21-2,12).

Nella successiva meta-analisi della IARC (2007) (50), sono stati analizzati i risultati di 23 lavori internazionali pubblicati nel periodo 1981-2005 (11 studi caso-controllo di popolazione e 12 studi caso-controllo).

Gli Autori hanno calcolato un rischio relativo pool (basato su 19 studi) per il melanoma di 1,15 (95% CI: 1,00-1,31) nei soggetti che avevano fatto uso di lampade e/o lettini per l'abbronzatura rispetto a quelli che non ne avevano fatto uso. Tuttavia, non vi era nessuna relazione con la dose dell'esposizione. Inoltre, il rischio di melanoma era maggiore nei soggetti che si erano esposti per la prima volta in giovane età < 35 anni (RR=1,75; 95% CI:1,35-2,26).

Nel 2010, è stato pubblicato uno studio caso-controllo di popolazione (1.167 casi e

1.101 controlli) condotto nel periodo 2004-2007 nello stato del Minnesota ⁵¹.

Gli Autori hanno analizzato l'uso, a casa, di lampade per l'abbronzatura, raccogliendo informazioni dettagliate circa le caratteristiche delle lampade usate (per esempio modello, emissioni di UVA e UVB). Gli Autori hanno trovato un aumento di rischio per melanoma nei soggetti che avevano fatto uso di lampade e/o lettini per l'abbronzatura (OR=1,74; 95% CI: 1,42-2,14) rispetto a chi non ne aveva fatto uso. Inoltre, è risultato che il rischio di melanoma era medio nei soggetti che avevano utilizzato apparecchi che intensificavano le radiazioni UVB (OR=2,86; CI: 2,03-4,03), più elevato, invece, nei soggetti che avevano utilizzato apparecchi che emettevano radiazioni UVA (OR=4,44; 95% CI:2,45-8,02) ed infine, che il rischio aumentava con gli anni e le sedute di esposizione.

In conclusione, i risultati della letteratura scientifica indicano che vi è un significativo aumento del rischio di melanoma nei soggetti che fanno uso di lampade e/o lettini per l'abbronzatura e che il rischio è maggiore se l'esposizione avviene in giovane età. Inoltre, i dati sono di supporto alle indicazioni della IARC ossia che l'abbronzatura ottenuta con lampade e/o lettini per l'abbronzatura è cancerogena per l'uomo e dovrebbe essere evitata per ridurre il rischio di melanoma ⁵².

In Italia, è stato promulgato un decreto del Ministero dello Sviluppo Economico (n.110 del 12 maggio 2011), con il quale sono state normate le apparecchiature di tipo estetico, e tra queste anche quelle abbronzanti, in cui si esplicita il divieto d'uso di queste apparecchiature per i minori di 18 anni, le donne in gravidanza, soggetti che soffrono o hanno sofferto di tumore della cute e quelli che si abbronzano con difficoltà o che si

scottano con facilità.

Uso di creme solari protettive

Le creme solari protettive sono state pensate per proteggere la cute dagli effetti dannosi dei raggi solari. Alcuni studi suggerivano che la limitazione dell'esposizione alle radiazioni UV utilizzando le creme solari protettive potesse ridurre il rischio di neoplasie cutanee non-melanoma fino al 78%. Viceversa, altri studi hanno suggerito che le creme solari protettive non proteggono dal rischio di melanoma.

Tuttavia, la sensibilità individuale al sole aveva probabilmente prodotto delle associazioni fuorvianti tra l'uso delle creme solari protettive e il rischio di melanoma. Infatti, pochi studi avevano stratificato i soggetti secondo la loro sensibilità al sole o condotto controlli appropriati per aggiustare questo fattore. Le persone sensibili alle radiazioni solari sono notoriamente a più alto rischio di melanoma e sono quelle più portate all'utilizzo di creme solari protettive ^{53, 54}.

Di conseguenza, il rischio aumentato di melanoma tra gli utilizzatori di creme solari potrebbe essere causato dalla sensibilità al sole dei soggetti, piuttosto che unicamente all'uso di creme solari protettive, o anche dalla falsa sicurezza che può indurre gli utilizzatori a esporsi per periodi più lunghi di quelli indicati dalle industrie produttrici di creme solari e dalla non consapevolezza che le applicazioni delle stesse devono essere ripetute nel corso della giornata ⁵². Quindi un mancato controllo degli effetti confondenti della sensibilità al sole produrrebbe rischi più grandi di quelli aggiustati per la sensibilità al sole.

Recentemente, sono stati pubblicati 2 studi di meta-analisi ^{55, 56} che hanno analizzato l'associazione tra rischio di melanoma e uso di creme solari protettive.

Nello studio di Huncharek et al. ⁵⁵, gli Autori hanno analizzato i dati di 11 studi caso-controllo. Gli Autori hanno calcolato un rischio per il melanoma di 1,01 (95% CI: 0,46-2,28) nei soggetti che avevano fatto uso di creme solari protettive rispetto a quelli che non avevano fatto uso, indicando che non vi era nessuna associazione tra creme solari protettive e rischio di melanoma.

In seguito, è stata pubblicata un'esaustiva meta-analisi di 18 studi caso-controllo pubblicati tra il 1966 e il 2003. Dennis et al. ⁵⁶ hanno calcolato un rischio pool per l'uso continuo di creme solari protettive uguale a 1,0 (95% CI: 0,8-1,2). Inoltre, hanno osservato che tra gli studi c'era una certa eterogeneità, per questo hanno condotto un'ulteriore analisi per cercare di spiegare le cause di questa eterogeneità, includendo la sensibilità al sole e la durata dell'esposizione, due variabili che sono considerate potenziali fattori di confondimento. Dopo l'aggiustamento, il rischio pool calcolato scendeva a OR=0,8 (95% CI: 0,6-1,0) e diminuiva ulteriormente aggiustando anche per la dose: OR=0,76 (95% CI: 0,65-0,90).

Quindi, gli Autori hanno concluso che l'uso di creme solari protettive riduce il rischio di melanoma.

In conclusione, clinicamente l'uso delle creme solari protettive ad elevato potere schermante e, comunque, adatte al proprio fototipo può ridurre il rischio di melanoma prevenendo le scottature; ciò nondimeno, le persone devono sapere che le creme solari

protettive proteggono la cute per periodi limitati di esposizione al sole e che le applicazioni delle stesse devono essere ripetute.

Per questo, i consumatori dovrebbero essere informati sui potenziali rischi alla salute associati con l'utilizzo di creme solari protettive durante l'esposizione intenzionale ⁵⁷.

Inoltre, le industrie di cosmetici dovrebbero riportare sulle confezioni delle creme solari protettive le attuali informazioni scientifiche sui potenziali rischi sulla cute e, soprattutto, che una prolungata esposizione al sole può causare una scottatura ed aumentare il rischio di melanoma.

Uso di contraccettivi orali

Negli ultimi 20 anni sono stati pubblicati molti lavori scientifici che hanno analizzato il rischio di melanoma e l'uso di contraccettivi orali, tuttavia i risultati spesso erano discrepanti.

Tra gli studi pubblicati spiccano due lavori, uno studio di meta-analisi del 1997 ed uno studio successivo di pooled analysis del 2002: entrambi hanno cercato di valutare attentamente questa associazione, tenendo conto di tutte quelle variabili di confondimento, che sono spesso responsabili della variabilità della misura del rischio.

Nella meta-analisi di Pfahlberg et al. ⁵⁸, gli Autori hanno analizzato i dati di 18 studi caso-controllo pubblicati nel periodo 1977-1999.

Il rischio pool calcolato era di 0,95 (95% CI: 0,87-1,04) per le donne che avevano fatto uso di contraccettivi orali rispetto a quelle che non ne avevano fatto uso.

Nella pooled analysis di Karagas et al.⁵⁹, gli Autori hanno acquisito e analizzato i dati originali di 10 studi caso-controllo per un totale di 2.391 casi e 3.199 controlli. In generale, gli Autori non hanno osservato alcun eccesso di rischio associato con l'uso di contraccettivi orali di durata ≥ 1 anno in confronto al non utilizzo o all'utilizzo < 1 anno (OR=0,86; 95% CI: 0,74-1,01). Gli studi non mostravano alcuna evidenza di eterogeneità.

Inoltre, nessuna relazione era presente tra l'incidenza di melanoma e durata dell'uso dei contraccettivi orali, l'età di inizio e l'anno di uso.

In conclusione, i dati della letteratura scientifica indicano che non c'è associazione tra rischio di melanoma ed uso di contraccettivi orali.

Terapia ormonale sostitutiva in menopausa

Diversi lavori scientifici hanno investigato il rischio di melanoma e la terapia ormonale sostitutiva in menopausa (HRT) e i cui risultati sono stati spesso contrastanti tra di loro, probabilmente perché la maggior parte di questi studi includevano solo pochi casi di donne che usavano l'HRT all'interno di una casistica più grande di donne che assumevano contraccettivi orali.

Recentemente, è stato pubblicato uno studio di pooled analysis⁶⁰ che ha analizzato in modo ampio il rischio di melanoma con la storia riproduttiva, l'uso di contraccettivi orali e la HRT. Gli Autori hanno analizzato i dati di 10 studi caso-controllo, pubblicati nel periodo 1985-2005, e non hanno trovato un rischio aumentato di melanoma nelle donne che erano state trattate con HRT.

In conclusione, i dati della letteratura scientifica indicano che non c'è associazione tra rischio di melanoma e HRT nelle donne trattate ⁶¹.

Melanomi multipli

Lo sviluppo di più di un melanoma primitivo multiplo (MPM) in un soggetto è un fenomeno ben documentato, che è stato descritto per la prima volta da Pack et al. nel 1952 ⁶². Da allora sono stati pubblicati diversi studi retrospettivi, i quali hanno riportato un'incidenza di MPM tra 1,2% e 8,2% nei soggetti con un melanoma primitivo.

Molti fattori di rischio associati con lo sviluppo di MPM sono stati identificati.

Questi includono, come per il melanoma unico, una storia familiare positiva per MPM e una storia individuale di nevi displastici ⁶³⁻⁶⁵.

In particolare, tra i soggetti con MPM, il 18-38% riportava una storia familiare positiva per melanoma ⁴² ed il 38 - 46% riportava una storia di nevi displastici ^{64, 67}.

L'analisi dell'intervallo di tempo tra il primo ed il secondo melanoma mostrava che il 51 - 59% dei soggetti con MPM aveva la diagnosi del secondo primitivo entro 12 mesi anche per effetto dell'aumentata attenzione diagnostica ^{63, 64}. Inoltre, in molti casi, la frequenza di un MPM può avere un background genetico e può essere associato con una storia familiare di melanoma. La frequenza di mutazioni nel gene soppressore CDKN2A del tumore è < 2% in tutti i pazienti con melanoma, ma esso aumenta dal 8% al 12% nei pazienti con uno sporadico MPM e del 47% in pazienti con MPM ed una positiva storia familiare ⁶⁸.

In conclusione, i dati della letteratura scientifica indicano che circa 1-8% dei soggetti con melanoma primitivo può sviluppare un MPM ed inoltre, che ai soggetti con MPM deve essere raccomandato non solo di sottoporsi a visita dermatologica per tutta la vita, ma anche di auto-esaminarsi periodicamente la cute e di non esporsi alle radiazioni UV solari o artificiali.

Occupazione

L'esposizione alle radiazioni UV e le caratteristiche fenotipiche dei soggetti sono i più importanti e ben conosciuti fattori di rischio per il melanoma, ma dati recenti hanno suggerito che la combinazione di questi fattori non è sufficiente a spiegare completamente il rischio di melanoma ^{43, 69}. Tuttavia, il rischio non identificato può essere il risultato di fattori apparentemente meno importanti come l'esposizione occupazionale a prodotti chimici e/o a radiazioni. Il ruolo dell'occupazione come fattore di rischio maggiore per il melanoma è stato largamente ignorato, tuttavia, quando preso in considerazione, è stato usato come un indicatore di stato socio-economico o per classificare le occupazioni svolte al chiuso o all'aperto.

In una recente revisione della letteratura scientifica sui fattori di rischio occupazionali non legati all'esposizione alla luce solare, Fortes e de Vries ⁶⁹ hanno analizzato i risultati di 60 lavori internazionali (10 studi caso-controllo e 50 di coorte), su 110 lavori identificati, pubblicati nel periodo 1985-2005. Inoltre, hanno classificato gli studi secondo due score: a) studio convincente (buon disegno dello studio, più di 400 soggetti

coinvolti, misura quantitativa dell'esposizione e aggiustamento adeguato per l'esposizione alla luce solare e caratteristiche fenotipiche dei soggetti); b) studio meno convincente, che non soddisfa due o più delle caratteristiche dello studio convincente.

Tra gli studi analizzati, 14 avevano valutato l'esposizione occupazionale ai prodotti e derivati del benzene. Gli Autori hanno osservato che tali lavoratori hanno un rischio elevato di melanoma di 1,4-8,0 rispetto ai lavoratori non esposti (12 di questi studi erano classificati come studi convincenti). Meno convincente è stato considerato l'aumento del rischio di melanoma tra i tipografi/litografi e più in generale tra i lavoratori della carta (RR: 1.2-8.7; solo 5 studi su 15 esaminati erano classificati come studi convincenti).

Incrementi di rischio di melanoma sono stati osservati anche tra i lavoratori esposti al tricloroetilene ed al cloruro di polivinile (PVC).

Tra i 15 studi considerati (3 studi caso-controllo e 12 di coorte), il rischio per i soggetti esposti rispetto ai non esposti era di 1,2-5,0.

Tuttavia, gli studi non erano omogenei tra loro, tanto che solo 5 su 15 studi erano stati classificati come studi convincenti.

Allo stesso modo, incrementi del rischio di melanoma sono stati osservati in alcune professioni, particolarmente esposte a pesticidi e PAH, quale quella degli agricoltori. Tra i 10 studi analizzati, di cui 7 erano classificati come convincenti, gli Autori hanno trovato un aumento di rischio da 1,6 a 4,8 nei soggetti esposti. L'esposizione alle radiazioni ionizzanti è stata analizzata in 21 studi di coorte, di cui 15 classificati come convincenti. Gli Autori hanno trovato un aumento di rischio di melanoma da 1,2 a 10,0

nei soggetti esposti.

In conclusione, anche se l'esposizione alle radiazioni solari è il più importante fattore di rischio di melanoma nella popolazione generale, differenti studi epidemiologici hanno rilevato un forte aumento di rischio di melanoma tra i lavoratori delle industrie del benzene, della tipografia/litografia e dell'elettricità/elettronica, rischio che può essere associato con esposizioni ai PAH, quali 7,12-dimetilben-(a)-antracene (DMBA) e alle diossine.

Prevenzione primaria

In generale, il melanoma potrebbe essere largamente prevenibile. Tuttavia, è difficile quantificare quanto la riduzione dell'incidenza e della mortalità del melanoma possa essere anticipata attraverso l'alterazione dell'esposizione al sole nei soggetti a rischio. Diversi studi inerenti alla variazione della numerosità dei nevi in relazione all'esposizione solare hanno valutato in che modo programmi di prevenzione, che agiscono sull'esposizione solare, possano far diminuire il rischio di melanoma. Negli ultimi anni, sono stati pubblicati diversi studi clinici randomizzati, che hanno valutato gli interventi di educazione per aumentare l'uso di creme solari protettive e di altre misure di foto-protezione (indumenti, orari protetti) nei bambini in età scolare e nei giovani adulti, mostrando spesso risultati modesti. Nello studio clinico randomizzato sull'uso di creme solari protettive tra i bambini in età scolare, Gallagher et al.⁷⁰ hanno trovato

una riduzione del 30-40% nell'insorgenza di nuovi nevi nel gruppo trattato con un supplemento di crema solare protettiva ad alto fattore di protezione ad integrazione della dose abituale rispetto al gruppo di controllo e che l'effetto di riduzione era più forte nei bambini con lentiggini.

Un risultato analogo, ma più modesto, è stato osservato anche nello studio di English et al. ⁷¹, dove gli Autori hanno osservato una riduzione del 3-11% di nevi nel gruppo trattato.

In contrasto, Naldi et al. ⁷² non hanno osservato alcun impatto significativo dei programmi educativi sulla riduzione delle scottature solari tra i bambini delle scuole elementari.

Tra gli studi randomizzati di comunità che hanno coinvolto una popolazione tra 16 e 65 anni, Weinstock et al. ⁷³ hanno osservato che l'intervento educativo sull'uso di creme solari protettive, tra i frequentatori di 7 spiagge del Rhode Island (USA), era stato efficace nell'83% dei soggetti coinvolti nello studio. Successi più modesti sono stati riportati da altri Autori ^{74, 75}. In conclusione, le raccomandazioni per la prevenzione primaria del melanoma dovrebbero enfatizzare di ridurre al minimo le esposizioni ai raggi solari e di evitare le scottature. Si dovrebbe evitare l'uso di lampade e lettini per acquisire o mantenere l'abbronzatura. Inoltre, la prevenzione primaria dovrebbe agire sui bambini e sugli adolescenti informandoli sui danni di una eccessiva e non corretta esposizione ai raggi solari e sull'uso corretto delle creme solari protettive. In questo contesto, l'informazione che la luce solare è un fattore di precoce invecchia-

mento cutaneo è di particolare aiuto alle donne. Inoltre, la prevenzione primaria dovrebbe informare che alcuni soggetti sono più sensibili ai raggi solari a causa della loro suscettibilità genetica; questi soggetti presentano capelli rossi, occhi azzurri, lentiggini, pelle chiara con difficoltà ad abbronzarsi e una facilità a scottarsi (cute con fototipo 1 e 2 di Fitzpatrick). L'autodeterminazione dei fattori di rischio noti, in quanto metodica già validata, ha permesso l'attuazione di specifici programmi di educazione sanitaria su larga scala, quali quelli rivolti ai genitori dei bambini in età scolare, al fine di indurre un'adeguata sensibilizzazione alla fotoprotezione.

PATOGENESI

Negli ultimi anni è stato dimostrato che lo sviluppo e la progressione del melanoma sono basati sul coinvolgimento di specifici geni, nell'ambito di vari pathway molecolari, che risultano associati dal punto di vista funzionale.

Studi di analisi genetica e molecolare hanno permesso di individuare numerose alterazioni a carico di tali pathway che sono coinvolti nella determinazione della storia biologica e clinica della malattia. Nonostante la notevole eterogeneità del melanoma dal punto di vista genetico e biologico, queste acquisizioni rendono possibile l'attuazione di una classificazione del melanoma in diversi "sottotipi molecolari", caratterizzati da differenti modalità di insorgenza e progressione ^{76, 78}.

Ciò porta ad abbandonare il vecchio concetto di melanoma come singola malattia dal punto di vista biologico.

Nell'era della "target therapy", diventa quindi fondamentale capire i complicati meccanismi biologici che sono alla base dello sviluppo e della progressione di questa neoplasia al fine di utilizzare terapie più mirate ed efficaci.

La patogenesi del melanoma è basata sull'acquisizione di alterazioni sequenziali a carico di specifiche regioni di DNA e/o di particolari meccanismi coinvolti nella regolazione del funzionamento cellulare; i recenti progressi della genomica e proteomica hanno infatti consentito di caratterizzare la tumorigenesi come un processo ad accumulo di mutazioni in specifici geni e/o di anomalie in specifici pathway metabolico-molecolari ^{78, 79} (Fig.1).

Vie Genetico-molecolari coinvolte nel melanoma

I geni, e i pathway da essi dipendenti presentano un ruolo cruciale nella patogenesi del melanoma, essi sono rappresentati da: CDKN2A (p16CDKN2A-CDK4-RB e p14CDKN2A-MDM2-p53 pathway); NRAS-BRAF (MAPK e PI3K-AKT pathway); cKIT e MITF.

CDKN2A

Il gene “Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2” (CDKN2A) è localizzato sul cromosoma 9p21 e codifica per due proteine: p16CDKN2A e p14CDKN2A ⁷⁸⁻⁸⁰.

Il gene CDKN2A è un oncosoppressore e agisce con un meccanismo d’azione di tipo recessivo; per cui è necessaria l’inattivazione di entrambi gli alleli per lo sviluppo del melanoma. In particolare, mutazioni di questo gene sono 7-10 volte più frequenti nei pazienti con una forte storia di ricorrenza familiare di tale neoplasia (tre o più membri della famiglia affetti), rispetto alla stragrande maggioranza (circa il 90%) di pazienti con malattia sporadica ⁸¹.

In condizioni fisiologiche, p16CDKN2A inibisce il sistema di proteinchinasi “Cyclin-Dependent Kinase 4 (CDK4)/Cyclin D1 (CCND1)”, che, a sua volta, inibisce l’attività antiproliferativa della proteina RB (“retinoblastoma-susceptibility”) e permette la progressione nel ciclo cellulare ⁷⁷⁻⁷⁹.

Nel melanoma, alterazioni del pathway 16CDKN2A-CDK4-RB sono correlate alla progressione della malattia; assenti nei nevi, iniziano a manifestarsi nei melanomi primari aumentando progressivamente nei metastatici ^{78, 79, 81}.

Le due principali alterazioni riscontrate a carico di tale pathway sono l’inattivazione di p16CDKN2A e l’amplificazione di CCND1: la prima è dovuta a meccanismi genetici,

mentre la seconda si osserva per lo più nei melanomi che non presentano mutazioni nei geni BRAF e NRAS, che insorgono soprattutto nelle zone cronicamente esposte al sole e a carico delle mucose ⁸². p14CDKN2A interferisce con le proteine Murine Double Minute 2 (MDM2) e p53, prevenendo la degradazione di quest'ultima il cui conseguente incremento di espressione previene la divisione cellulare e promuove l'apoptosi.

L'inattivazione di p53 può essere dovuta a mutazioni di p14CDKN2A, ad aumentata espressione di MDM2 oppure al silenziamento del gene TP53.

Nel melanoma, la riduzione dei livelli della proteina p53 comporta un'aumentata aggressività del tumore e una ridotta risposta terapeutica ⁷⁹⁻⁸⁴.

NRAS-BRAF

RAS e BRAF sono due molecole implicate nella risposta delle cellule agli stimoli mitotici extracellulari e hanno un ruolo centrale nella regolazione della crescita, sopravvivenza e proliferazione cellulare. I prodotti della famiglia dei geni RAS sono piccole proteine legate alla membrana citoplasmatica; si distinguono 3 isoforme tessuto-specifiche: HRAS, KRAS e NRAS. Le mutazioni di NRAS sono quelle più frequenti nel melanoma (nel 15-30% dei casi) ^{78, 79, 83, 84}.

La stimolazione oncogenica di NRAS è in grado di attivare specifiche proteine citoplasmatiche con funzione chinasi poste a valle: RAF e Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) ⁸³.

La famiglia di chinasi RAF comprende tre proteine (ARAF, BRAF e CRAF) che fanno parte della cascata di trasduzione del segnale denominata Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway. Nei melanociti, BRAF induce l'attivazione della chinasi

MEK, la quale, a sua volta, attiva ERK, che costituisce l'effettore finale della cascata MAPK.

Nel melanoma, il gene BRAF risulta mutato nel 40-60% dei casi; la mutazione prevalente (circa il 90% dei casi) è rappresentata dalla sostituzione di una valina con acido glutammico al codone 600 (V600E BRAF) ^{85, 86}.

Le mutazioni a carico della regione chinasi di BRAF, determinano, mediante la fosforilazione e quindi attivazione di ERK, una continua stimolazione della proliferazione cellulare e della crescita tumorale. Tuttavia, BRAF è mutato anche nei nevi comuni ⁸⁷, ciò suggerisce che la sua attivazione oncogenica è una condizione necessaria, ma non sufficiente, per lo sviluppo del melanoma.

I melanomi che insorgono in aree cutanee esposte in maniera intermittente al sole presentano la più alta frequenza di mutazioni del gene BRAF.

Negli ultimi anni, è stato dimostrato che alcune varianti genetiche del recettore di membrana Melanocortin-1 Receptor (MC1R) non hanno la capacità di stimolare in modo adeguato la produzione della melanina che esplica il ruolo di proteggere la cute dai danni indotti dai raggi UV ⁸⁸. La combinazione tra la presenza di tali varianti di MC1R e l'esposizione intermittente alle radiazioni solari è considerata responsabile dell'attivazione oncogenica di BRAF, mediante un aumento indotto dei livelli intracellulari di AMP ciclico ⁸⁹.

Inoltre, in presenza di mutazioni del gene NRAS che sono state dimostrate essere mutualmente esclusive con le mutazioni del gene BRAF, la trasduzione del segnale mitogeno nell'ambito del MAPK pathway è deviato su CRAF, che quindi è responsabile

del mantenimento della stimolazione della proliferazione cellulare in questo sottogruppo di melanomi ⁹⁰, in tal modo si instaura resistenza alla terapia con inibitori di BRAF ⁹¹.

PI3K

Un altro sistema di regolazione della crescita cellulare, prevalentemente dipendente da RAS attivato, è rappresentato dal pathway incentrato sulla proteina PI3K e costituito dalla cascata di trasduzione del segnale delle proteine PTEN, PI3K e AKT (in particolare, l'isoforma AKT3 nel melanoma).

In condizioni fisiologiche, l'attività fosfatasica della proteina PTEN riduce il livello intracellulare dei fosfoinositoli PIP2 e PIP3 (prodotti dall'attivazione di PIK3) ⁹³.

Quest'ultima determina infatti un aumento dei livelli intracellulari di PIP3 che vanno ad attivare AKT e, di conseguenza, il suo substrato mTOR, il quale regola la sintesi di proteine coinvolte nella sopravvivenza e crescita cellulare nonché nell'apoptosi ^{78,79}.

Nel melanoma, il gene PTEN è deletato nel 30-40% dei casi sporadici e nel 30-50% delle linee cellulari ⁹³.

L'effetto combinato della perdita di PTEN e dell'attivazione del sistema PI3K-AKT, risulta in una crescita aberrante delle cellule neoplastiche e resistenza all'apoptosi e, quindi, si ha una mancata risposta al trattamento chemioterapico.

MITF

Tra i prodotti genici che operano a valle del pathway di trasduzione del segnale BRAF-

MEK-ERK, il più importante nel melanoma è rappresentato dal “Microphthalmia-associated Transcription Factor”⁹². Quest’ultimo è coinvolto nella pigmentazione cutanea ma anche nei meccanismi di proliferazione e differenziazione delle cellule melanocitarie⁶⁴.

Bassi o assenti livelli di MITF predispongono la cellula all’apoptosi, livelli intermedi promuovono la sopravvivenza e proliferazione cellulare, elevate quantità di MITF nella cellula hanno attività antiproliferativa^{92,93}.

Nel melanoma si sono probabilmente sviluppati dei meccanismi per mantenere i livelli di MITF in un range tale da favorire la tumorigenesi. Nelle cellule neoplastiche MITF interagisce con effettori che promuovono la progressione del ciclo cellulare e riducono l’apoptosi come CDK2 e BCL-2.

In particolare l’amplificazione del gene MITF è stata osservata in circa il 15-20% dei melanomi metastatici portatori di mutazioni di BRAF⁹⁴.

c-KIT

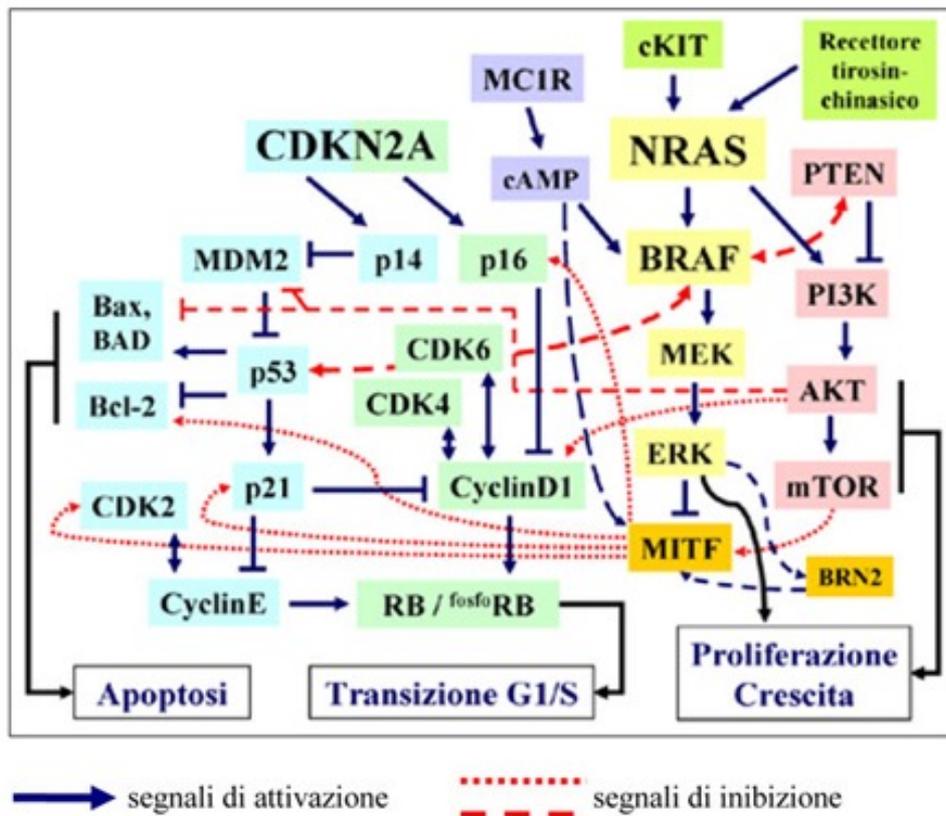
c-KIT è il recettore tirosin-chinasico per lo “stem cell factor” che nei melanociti regola la migrazione e la sopravvivenza cellulare. Nonostante non sia frequentemente espressa nei melanomi, particolari alterazioni del recettore sono coinvolte nella patogenesi di alcuni sottogruppi di queste neoplasie. Specifiche variazioni di sequenza del gene c-KIT causano attivazione costitutiva del dominio chinasico, risultando in un’induzione continua della proliferazione cellulare, attraverso la stimolazione del MAPK pathway⁹⁵. Le mutazioni di c-KIT sono state riscontrate nei melanomi acrali (10% dei casi), mucosali (15-20% dei casi) ed insorti nelle aree cutanee cronicamente esposte alle radiazioni solari (5% dei casi)⁹⁶.

La progressione dai melanociti normali a quelli trasformati in senso maligno, fino ad arrivare alla formazione delle cellule aggressive metastatiche, è pertanto il risultato della stretta combinazione di alterazioni, aumento o riduzione, dell'attività degli effettori che agiscono nei vari pathway molecolari.

Sono stati ipotizzati due modelli di “melanomagenesi”: di tipo “Lineare” e “Non lineare”.

Il primo si basa sull'accumulo progressivo delle alterazioni molecolari sopra citate ⁹⁷, il secondo vede il coinvolgimento di cellule staminali tessutali, dalle cui alterazioni deriverebbero direttamente le cellule di melanoma in fase di crescita superficiale, verticale o già in fase metastatica ⁹⁷⁻⁹⁹.

Figura 1. Principali pathway coinvolti nella patogenesi del melanoma



DIAGNOSI

Il melanoma cutaneo è un tumore maligno di origine neuroectodermica che insorge nella maggior parte dei casi “de novo” su cute apparentemente sana o, in una minoranza di soggetti, dalla modificazione di un nevo pre-esistente. Esso può comparire ovunque sulla cute, ma compare con maggior frequenza al tronco nel sesso maschile e agli arti inferiori nel sesso femminile.

L'esame clinico supportato dalla valutazione strumentale tramite dermoscopia ha aperto una nuova frontiera diagnostica soprattutto nella valutazione del melanoma sottile, di dimensioni limitate (< 6 mm) e nelle forme in cui i parametri clinici ABCDE non sono significativi ¹⁰⁰⁻¹⁰⁴.

DIAGNOSI CLINICA

Da molti anni, la regola dell'ABCDE (Asimmetria, Bordi irregolari, Colore disomogeneo, Dimensioni > 6 mm, Evoluzione rapida) (Figura 2) rappresenta il principale indicatore clinico per l'identificazione del melanoma cutaneo; tuttavia ha una bassa sensibilità per le lesioni piccole e nodulari. La diagnosi precoce del melanoma nodulare è fondamentale, considerando che questa forma ha un comportamento biologico aggressivo ed una prognosi infausta. Quindi, nel melanoma nodulare, i parametri di valutazione cambiano e sono rappresentati dagli acronimi EFG (“Elevated”, elevazione; “Firm”, consistenza dura; “Growing progressively”, a rapida crescita) ¹⁰³ e 3 C (Irregular Color, Contour and Change) ¹⁰⁵.

Un altro indicatore clinico utilizzato per il riconoscimento di un melanoma è il cosiddetto “brutto anatroccolo”, ossia un nevo con le caratteristiche diverse dagli altri nevi

presenti in un soggetto. Il segno del “brutto anatroccolo” ha una buona sensibilità (0,85) e specificità (0,83) per la diagnosi di MM ¹⁰⁶.

In base alle differenti modalità morfologiche ed evolutive possiamo suddividere le caratteristiche cliniche del melanoma cutaneo in tre forme principali: melanoma piano, melanoma piano-cupoliforme e cupoliforme ¹⁰⁸.

Melanoma piano o sottile: rappresenta la forma più frequente (70%), con uno spessore di Breslow favorevole e un’evoluzione più lenta. Si presenta in genere come una lesione dal diametro variabile da 5-6 mm a più centimetri, a volte palpabile, che spesso presenta al suo interno micropapule con perdita della fisiologica plicatura cutanea. Il colore del tumore è variabile dal marrone al nero, ma può mostrare anche aree rosate (neoangiogenesi) o bianco-grigiastre (regressione).

Melanoma piano-cupoliforme: corrisponde all’evoluzione della forma piana nella fase di accrescimento verticale, che invariabilmente fa seguito alla fase radiale. Clinicamente è caratterizzato dalla comparsa di un elemento papuloso e/o nodulare nel contesto della lesione.

Melanoma cupoliforme: rappresenta il 10-15% di tutti i melanomi ed espressione di una immediata crescita verticale. È caratterizzato dalla comparsa, *ab initio*, di un nodulo di colore variabile dal bruno-nerastro al nero-bluastrò al rosso-marrone. Il pigmento può essere distribuito irregolarmente o essere del tutto assente (melanoma acromico). Spesso la lesione è ulcerata e facilmente sanguinante.

Figura 2. Regola dell'ABCDE

	<p>A come Asimmetria della lesione</p>
	<p>B come Bordi irregolari e frastagliati a “carta geografica”</p>
	<p>C come Colore disomogeneo a varie tinte (nero, rosso-bruno, rosa non uniforme) o nero molto intenso</p>
	<p>D come Dimensioni > 6 mm</p>
	<p>E come Evoluzione progressiva; la lesione tende a crescere e ad allargarsi rapidamente con modifiche cromatiche</p>

DIAGNOSI STRUMENTALE

Diagnosi Dermoscopica

La dermoscopia è una tecnica in vivo, non invasiva, che permette di valutare a più forte ingrandimento la lesione melanocitaria e di individuare la presenza di strutture submicroscopiche e vascolari e la distribuzione del pigmento ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Il metodo diagnostico per l'esame dermoscopico delle lesioni pigmentate è stato recentemente standardizzato e proposto come riferimento nel corso del Consensus Net Meeting on Dermoscopy (CNMD) ¹¹⁰. Il metodo diagnostico dermoscopico proposto consta di una procedura in due "step". Il primo step consiste nel differenziare la natura melanocitica o non melanocitica della lesione pigmentata in questione. Il secondo step diagnostico prevede la differenziazione tra le lesioni melanocitarie benigne e maligne mediante l'applicazione di differenti algoritmi diagnostici: l'analisi di pattern modificata^{111, 112}, l'ABCD di Stolz ¹¹³, il metodo di Menzies¹¹⁴ e il 7-point check-list¹¹⁵.

Videodermatoscopia computerizzata

La videodermatoscopia computerizzata è una tecnica diagnostica non invasiva che permette di migliorare la diagnosi delle lesioni pigmentate cutanee in modo da pervenire sempre più precocemente alla diagnosi del melanoma. Inoltre l'archiviazione delle immagini dei singoli nevi consente di monitorare la loro evoluzione nel tempo.

Microscopia laser confocale (RCM, "Reflectance Confocal Microscopy")

La Microscopia laser confocale (RCM) è uno strumento diagnostico non invasivo, che produce immagini tessutali in vivo con una risoluzione simile a quella istologica.

Impiega un raggio laser a bassa potenza 830 nm che scannerizza la pelle orizzontalmente, producendo dettagliate immagini in bianco e nero, dall'epidermide fino al derma papillare superiore, con uno spessore che arriva a 200-300 μm . Il contrasto delle immagini RCM è dovuto prevalentemente alla differenza nella riflettenza dei componenti tessutali e della melanina citoplasmatica, le lesioni melanocitarie rappresentano il tessuto più appropriato per questo tipo di indagine.

Recentemente, la RCM ha permesso di correlare in vivo i parametri dermoscopici con gli aspetti cito-architetturali delle lesioni melanocitarie ^{116, 118}.

DIAGNOSI ISTOPATOLOGICA

Nel 1984, Clark et al. hanno identificato fasi differenti nello sviluppo del melanoma, in cui da un'iniziale proliferazione radiale (fase orizzontale), si procede ad una fase di crescita verticale con estensione in profondità ¹¹⁸.

La prima fase di crescita orizzontale è caratterizzata, istologicamente, da una proliferazione intra-epiteliale di melanociti atipici o da un'iniziale infiltrazione del derma papillare.

La fase di crescita verticale è caratterizzata da una proliferazione espansiva dermica, che non è una semplice estensione della neoplasia in profondità, ma è la comparsa di un nuovo aspetto morfologico e di nuove caratteristiche biologiche nel melanoma maligno, il quale acquisisce nuove capacità tumorigeniche con possibilità di diffusione a distanza. In particolare, i due criteri principali per il riconoscimento della fase di crescita verticale nei melanomi "sottili" sono: presenza di uno o più aggregati di cellule neoplastiche nel derma che abbiano dimensioni maggiori del più grande aggregato intra-epidermico e presenza di figure mitotiche nel derma papillare ^{119, 120}.

CARATTERISTICHE ISTOLOGICHE E MOLECOLARI

La tradizionale classificazione clinico-patologica del melanoma, basata sull'aspetto clinico macroscopico e sulle caratteristiche istopatologiche, comprende quattro principali istotipi:

a) melanoma a diffusione superficiale;

b) melanoma nodulare;

c) melanoma su lentigo maligna;

d) melanoma acrale-lentiginoso.

Tale classificazione si è diffusa a seguito del pioneristico contributo di Clark, McGovern, Mihm, Reed e altri alla fine degli anni '60 e degli anni '70^{121, 122}. Da allora, sono stati però identificati altri istotipi, meno frequenti, ma pur sempre ben caratterizzati, tra i quali il melanoma desmoplastico e il melanoma nevoide.

Originariamente, è stata avanzata l'idea che ciascun principale istotipo di melanoma fosse associato ad un peculiare comportamento clinico e ad una diversa prognosi^{121, 122}. Tuttavia, questa ipotesi iniziale non è stata confermata negli studi successivi, tra cui la recente valutazione di un'ampia casistica effettuata dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC) Melanoma Taskforce¹²⁴⁻¹²⁶.

Attualmente, la prognosi di un paziente con melanoma primitivo con malattia clinicamente localizzata dipende principalmente dallo spessore della neoplasia, sebbene altri parametri, tra i quali l'attività mitotica, la presenza di ulcerazione, la sede anatomica

e, in minor misura, caratteristiche cliniche del paziente quali l'età e il sesso, abbiano mostrato un significato prognostico indipendente.

Al contrario, i principali istotipi di melanoma non hanno un significato prognostico indipendente. Inoltre, le attuali raccomandazioni per la gestione clinica dei pazienti affetti da melanoma primitivo localizzato, compresa l'ampiezza dei margini di escissione e l'appropriatezza della biopsia del linfonodo sentinella, sono basate principalmente sullo spessore della neoplasia e altri parametri^{127, 128}, mentre l'istotipo in base alla classificazione WHO non è un parametro che influenza il trattamento, né per il melanoma primitivo né per quello metastatico. Per queste motivazioni, alcuni autorevoli studiosi hanno sostanzialmente ritenuto opportuno l'abbandono definitivo della tradizionale classificazione istopatologica del melanoma.

Negli ultimi 10 anni, sono state identificate una serie di alterazioni molecolari associate al melanoma. In particolare, sono state documentate specifiche mutazioni nelle chinasi della via di trasduzione del segnale di MAP ("Mitogen-Activated Protein Kinase"), in circa il 70% dei melanomi e, più recentemente, sono state valutate le correlazioni tra tali mutazioni e parametri clinici e patologici^{129, 130} e il valore delle alterazioni molecolari a potenziale oncogenico come possibili nuovi e selettivi bersagli terapeutici¹³¹⁻¹³⁴.

Queste recenti acquisizioni hanno stimolato l'interesse a una classificazione molecolare del melanoma al fine di identificare sottogruppi di pazienti, che condividendo meccanismi patogenetici molecolari simili o identici, si comportano clinicamente in maniera simile e potenzialmente possono beneficiare di comuni strategie terapeutiche. Di

grande interesse, è il confronto (in continua evoluzione in base al rinnovarsi delle conoscenze) tra la tradizionale classificazione clinico-patologica e la classificazione molecolare basata sulle mutazioni somatiche. Ad esempio, i melanomi associati a prominente danno solare (melanoma su lentigo maligna) in genere mostrano mutazioni di N-RAS e talora di c-KIT, mentre i melanomi a diffusione superficiale che insorgono nella cute di aree sottoposte ad esposizione solare intermittente, spesso mostrano mutazioni di BRAF^{139, 140, 145-147}. Vi è attualmente un notevole consenso sull'opportunità di procedere a una sempre più dettagliata caratterizzazione molecolare del melanoma. L'obiettivo finale è quello di identificare e selezionare in maniera opportuna i pazienti che possano beneficiare di terapie molecolari mirate.

Classificazione clinico-patologica di Clark

Nel 1967, Clark pubblicò la classificazione istogenetica del melanoma che ancora oggi costituisce la base per la classificazione WHO attualmente utilizzata¹²¹. Clark descrisse tre istotipi di melanoma (*melanoma su lentigo*, *melanoma a diffusione superficiale* e *melanoma nodulare*), distinti principalmente sulla base delle caratteristiche della componente intra-epidermica alla periferia (piuttosto che al di sopra) della componente dermica invasiva. Le caratteristiche istopatologiche in base alle quali si distinguono gli istotipi erano di tipo architetturale e relative alla componente *in situ*, intra-epidermica (compresa l'entità di crescita pagetoide e lentiginosa) e anche alcune modificazioni della componente non-neoplastica, quali modificazioni epidermiche e associata elastosi solare dermica.

Inoltre, caratteristiche cliniche, quali la sede anatomica e l'età del paziente, contribuivano alla definizione dell'istotipo e pertanto la classificazione di Clark è generalmente considerata una classificazione clinico-patologica.

Nella sua descrizione originale, Clark ipotizzò che i diversi istotipi fossero associati a una diversa prognosi, un suggerimento supportato nel 1969 e successivamente confermato da McGovern^{121,122}. Nella pubblicazione del 1969, Clark et al. mostrarono inoltre che la prognosi del melanoma risultava essere associata alla profondità di invasione, categorizzata in base ai livelli di cute coinvolta (oggi noti come livelli di Clark)^{121, 122}. Sebbene fosse stato documentato, in precedenza, che la profondità di invasione fosse associata alla prognosi del melanoma, questo fu precedente alla nota pubblicazione di Breslow nel 1970 sul significato prognostico dello spessore¹³⁸. Nel 1970, McGovern pubblicò la sua classificazione, simile a quella proposta da Clark, sebbene utilizzando una diversa terminologia: melanoma insorto su "*Hutchinson's melanotic freckle*" (nella terminologia di Clark: "associato a *lentigo maligna*"), melanoma insorto su melanosì pre-maligna (Clark: "melanoma a diffusione superficiale") e melanoma nodulare (Clark: "melanoma nodulare")¹²².

Da allora, sono stati descritti un numero crescente di ulteriori istotipi, definiti sulla base di criteri clinici e patologici, tra i quali il melanoma desmoplastico, il melanoma nevoide e melanomi insorti in associazione con il nevo blu. Nell'attuale ed ultima versione della classificazione WHO dei Tumori della Cute (2006), i 4 istotipi principali sono elencati accanto a 6 altri istotipi meno frequenti¹²³.

Caratteristiche clinico-patologiche

Nel 1984, Clark et al. hanno identificato fasi differenti nello sviluppo del melanoma, in cui da un'iniziale proliferazione prevalentemente piatta, che si estende lungo il raggio di una circonferenza irregolare (fase orizzontale), si procede ad una fase di crescita verticale, perpendicolare alla precedente, con estensione in profondità ¹³⁹.

La prima fase di crescita orizzontale è caratterizzata, istologicamente, da una proliferazione intra-epiteliale di melanociti atipici (melanoma *in situ*) o da un'iniziale infiltrazione del derma papillare. In tale fase, il melanoma anche se invasivo mostra una buona prognosi.

La fase di crescita verticale è caratterizzata da una proliferazione espansiva dermica, che non è una semplice estensione della neoplasia in profondità, ma è la comparsa di un nuovo aspetto morfologico e di nuove caratteristiche biologiche nel melanoma, il quale acquista nuove capacità tumorigeniche con possibilità di diffusione a distanza.

In particolare, i due criteri principali per il riconoscimento della fase di crescita verticale nei melanomi "sottili" sono: a) presenza di uno o più aggregati di cellule di melanoma nel derma che abbiano dimensioni maggiori del più grande aggregato intra-epidermico; b) presenza di figure mitotiche nel derma papillare. Ulteriori criteri secondari includono: a) compressione od infiltrazione dei tessuti circostanti da parte del nodulo "espansivo"; b) cellule neoplastiche meno pigmentate e più grandi (atipiche) di quelle osservate nella fase di crescita orizzontale; c) infiltrato linfoistiocitoide reattivo meno cospicuo rispetto a quello osservato nella fase di crescita orizzontale; d) la fase di crescita verticale è spesso osservata in corrispondenza delle aree di parziale regressione

della fase di crescita orizzontale ^{130, 131}.

Da un punto di vista istopatologico, gli istotipi più frequenti di melanoma sono distinti principalmente sulla base di caratteristiche morfologiche della componente intra-epidermica del tumore adiacente alla componente dermica invasiva. Quando la componente dermica è presente, essa non mostra caratteristiche specifiche nei diversi istotipi principali di melanoma.

Melanoma a diffusione superficiale

Il melanoma a diffusione superficiale (SSM) generalmente insorge in pazienti di età più giovane (età mediana 50 anni) rispetto a pazienti affetti da melanoma nodulare (NM) o melanoma su *lentigo maligna* (LMM). Tipicamente, coinvolge sedi anatomiche sottoposte a esposizione solare intermittente, quali il tronco, il dorso e le estremità. Il SSM generalmente si presenta come una lesione piana dal profilo irregolare, pigmentazione variegata e a lenta crescita. La lesione si accresce in modo radiale fino a che non si sviluppa invasione dermica; quest'ultima generalmente si associa clinicamente con la presenza di un'area rilevata sul piano cutaneo. Istologicamente, la componente intra-epidermica di un SSM si caratterizza per la presenza di melanociti epitelioidei e pleomorfi disposti in teche o in singole unità, con risalita intra-epidermica pagetoide (Figura 3a e 3b). Talora, la componente intra-epidermica mostra un *pattern* di crescita a tipo nevo displastico.

Il SSM invasivo è una proliferazione melanocitaria asimmetrica, caratterizzata da una distribuzione irregolare di melanociti disposti sia in teche sia in singole unità a livello

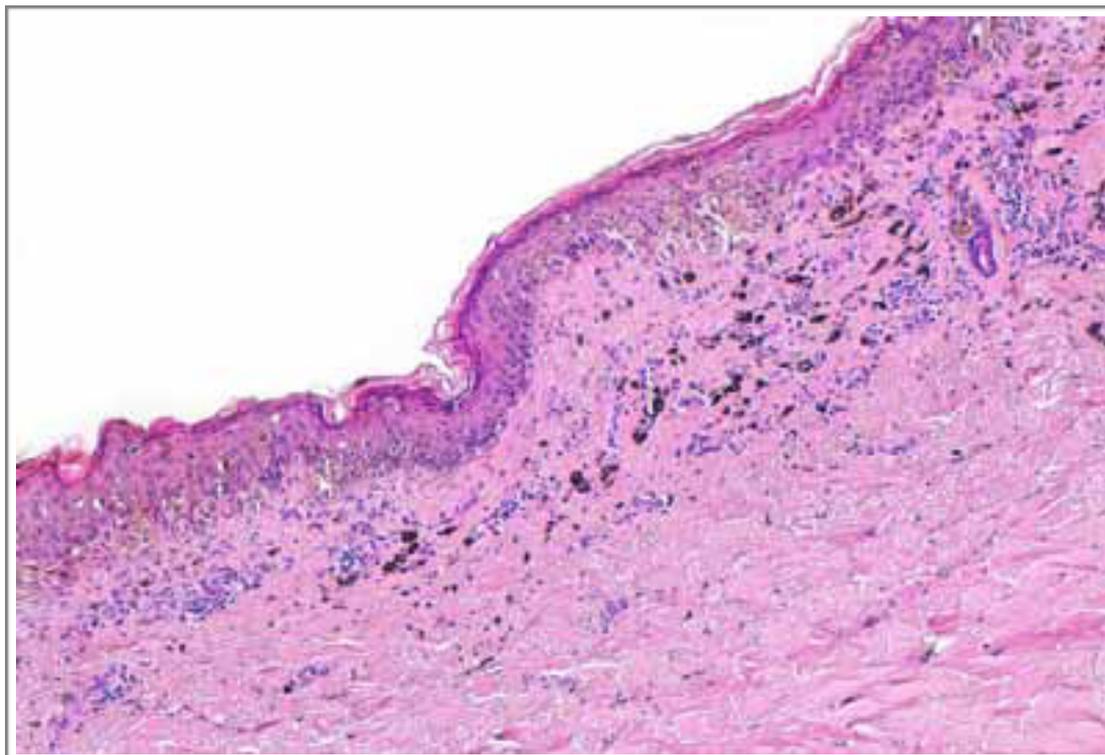
intra-epidermico e una componente dermica nella quale non si osserva una chiara maturazione (diminuzione nella dimensione delle teche, delle cellule, dei nuclei e dei nucleoli nella porzione più profonda della lesione rispetto alla componente più superficiale). Nel contesto della lesione vi è generalmente una distribuzione irregolare del pigmento. Sono presenti figure mitotiche, talora atipiche.

Figura 3a



Melanoma a diffusione superficiale

Figura 3b



Melanoma a diffusione superficiale: la componente intra-epidmica si caratterizza per la presenza di melanociti atipici disposti in teche o in singole unità, con risalita intraepidmica pagetoide

Melanoma nodulare (NM)

I NM insorgono in età più avanzata rispetto ai SSM (età mediana 70 anni). Essi possono insorgere in qualsiasi sede e generalmente si presentano con un nodulo a rapida crescita dal profilo polipoide/esofitico. L'epidermide sovrastante può essere atrofica e/o ulcerata.

Clinicamente, possono essere confusi con altre neoplasie cutanee, quali carcinoma a cellule basali, specialmente se amelanotici.

Istologicamente, per definizione, le cellule di melanoma possono essere presenti nell'epidermide sovrastante, ma non si estendono tre creste epidermiche oltre i margini laterali della componente nodulare.

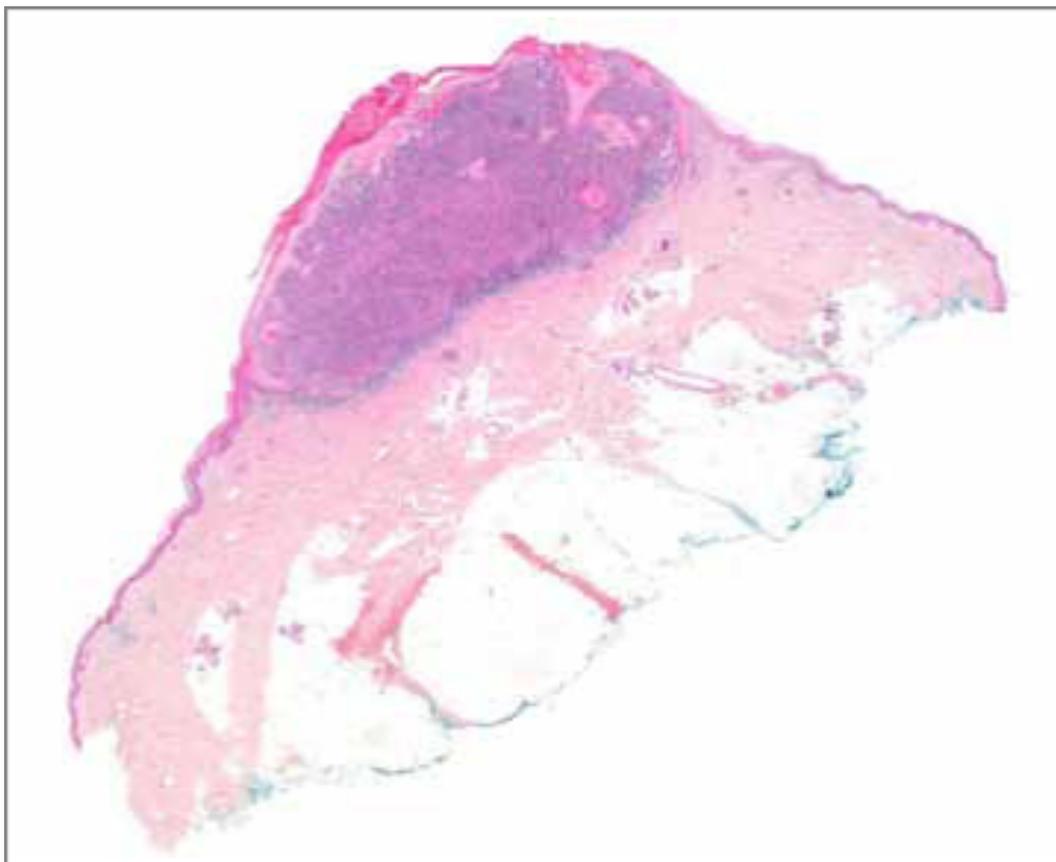
La componente dermica è caratterizzata da teche e/o aggregati confluenti, generalmente senza fenomeni di maturazione (Figura 4a e 4b). Si possono osservare melanociti a morfologia epitelioidale, fusata, nevoide o pleomorfa in variabile combinazione, le cellule mostrano espressioni di ipercromasia, pleomorfismo e nucleoli prominenti.

Figura 4a



Melanoma nodulare

Figura 4b



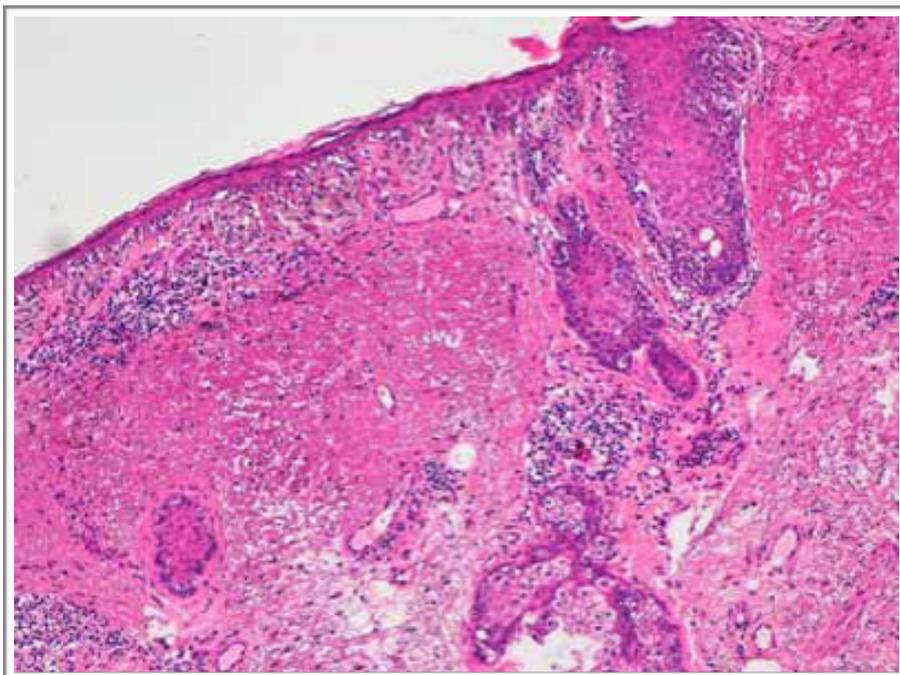
Melanoma nodulare: la componente dermica è caratterizzata da teche ed aggregati confluenti di melanociti epitelioidi e pleomorfi e, per definizione, non si estende lateralmente oltre 3 creste epidermiche.

Figura 5 a. Melanoma su lentigo maligna



Lentigo maligna - melanoma

Figura 5b



Lentigo maligna: proliferazione lentiginosa di melanociti atipici su cute severamente foto-danneggiata, con estensione nell'epitelio dei follicoli piliferi. L'epidermide mostra atrofia con perdita del profilo della rete ridges.

La LMM generalmente coinvolge sedi cronicamente foto-esposte quali la regione testa/collo e gli avambracci. Spesso, si presenta come una chiazza di ampie dimensioni, con pigmentazione variegata e contorni irregolari in pazienti di età avanzata (età mediana 80 anni).

La chiazza può diventare rilevata sul piano cutaneo qualora la neoplasia mostri invasione nel derma. Istologicamente, la LMM è caratterizzata da una proliferazione lentiginosa di melanociti atipici su cute severamente foto-danneggiata (Figura 5a). L'epidermide mostra atrofia con perdita del profilo della rete *ridges*, danno attinico severo (elastosi solare) ed assottigliamento dermico. Spesso, si documenta l'estensione della proliferazione melanocitaria nel contesto delle porzioni più superficiali dell'epitelio dei follicoli piliferi e dei dotti sudoripari e la presenza di occasionali melanociti giganti multinucleati.

Il termine *lentigo maligna* si riferisce al melanoma con crescita esclusivamente intra-epidermica (melanoma *in situ*). Quando la neoplasia si estende nel derma, si utilizza il termine di melanoma su *lentigo maligna*. La componente invasiva è costituita da melanociti atipici di forma fusata e, più raramente, epitelioide o nevoide, disposti in aggregati e teche anisodimensionali, spesso commiste ad uno scarso infiltrato infiammatorio con melanofagi.

Melanoma acrale-lentiginoso

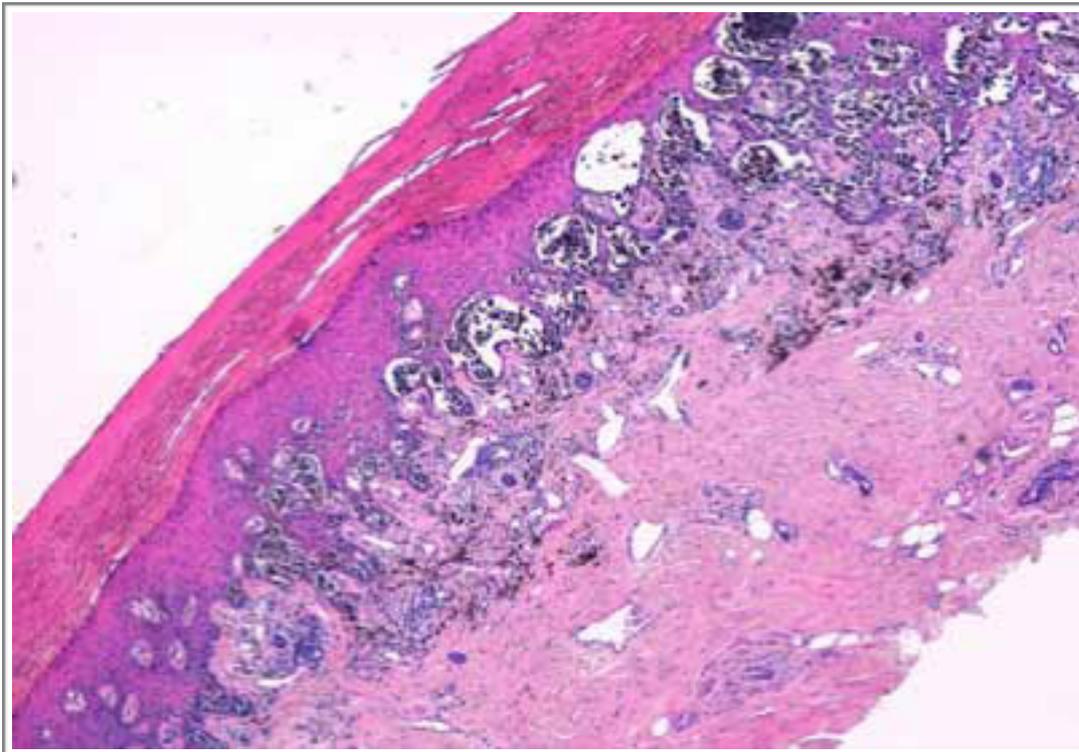
Il melanoma acrale-lentiginoso (ALM) coinvolge le sedi acrali (regione palmare, plantare e subungueale). Generalmente, si presenta come una chiazza pigmentata a lenta crescita. Il melanoma acrale lentiginoso ha un aspetto istopatologico peculiare: in fase di crescita orizzontale, la lesione è caratterizzata da una marcata acantosi, strato corneo ispessito, allungamento della rete *ridges* e da una proliferazione lentiginosa di melanociti atipici a livello giunzionale, con migrazione delle cellule neoplastiche fino agli strati più superficiali dell'epidermide (Figura 6a). Spesso, si associa un infiltrato linfocitario a livello della giunzione dermo-epidermica. La componente *in situ* di un ALM è costituita da melanociti atipici con nuclei ingranditi e nucleoli prominenti e citoplasma repleto di melanina. I melanociti mostrano prominenti e lunghi processi dendritici. I melanociti atipici spesso coinvolgono i dotti sudoripari, estendendosi nel derma reticolare profondo. In fase di crescita verticale, gli aggregati neoplastici sono costituiti da melanociti di forma fusata sullo sfondo di una spiccata desmoplasia.

Figura 6a



Melanoma acrale-lentiginoso

Figura 6b



Melanoma acrale-lentiginoso: la componente intra-epidermica mostra una proliferazione lentiginosa di melanociti atipici a livello giunzionale con migrazione delle cellule neoplastiche fino agli strati più superficiali dell'epidermide.

Melanoma desmoplastico

Il melanoma desmoplastico mostra cellule fusate fibroblasto-simili (scarso citoplasma e nucleo ipercromatico) e non pigmentate con variabile atipia citologica, disposte tra le fibre collagene dermiche immerse in abbondante stroma fibroso. Talora le cellule neoplastiche si dispongono in *pattern* storiforme. Spesso si osserva una cellularità infiammatoria (linfociti e plasmacellule) nel contesto e/o alla periferia del tumore e marcata elastosi solare. Si osserva neurotropismo in circa il 30% dei casi che vengono classificati come melanomi desmoplastici neurotropi. La componente giunzionale può essere minima, con aspetto tipo LMM, od assente.

Melanoma su nevo congenito gigante

Il melanoma su nevo congenito gigante è spesso asimmetrico e ben demarcato rispetto al nevo congenito adiacente. La neoplasia spesso è ulcerata. La componente intra-epidermica è generalmente composta da melanociti epitelioidi pigmentati, con pagetoidismo. Nella componente dermica si osservano noduli espansivi con cellule marcatamente atipiche, variabilmente pigmentate, associate ad elevata attività mitotica, aree di necrosi e necrosi di singole cellule.

Melanoma nevoide

Il melanoma nevoide rappresenta l'1-2% dei melanomi ed è un istotipo che simula da un punto di vista architetturale e citologico un nevo comune acquisito. Le lesioni mostrano un profilo cupoliforme, polipoide o verrucoso. Generalmente, si tratta di melanomi che hanno una minima o assente crescita intra-epidermica pagetoide, un profilo relativamente simmetrico ed appaiono ben circoscritti lateralmente.

La componente dermica è caratterizzata da aggregati o teche confluenti di melanociti

di piccole dimensioni, piuttosto monomorfi, con nuclei ipercromatici, con spiccata attività mitotica nelle lesioni di cospicue dimensioni. Spesso si tratta di melanomi che insorgono su nevo.

Istotipi rari

Oltre alle varianti sopra elencate, il melanoma può presentarsi all'esame istopatologico con aspetti variabili e configurare istotipi rari, che pongono talora problematiche di diagnosi differenziale con nevi melanocitici (per esempio, il melanoma spitzoide) o con neoplasie a differenziazione epiteliale e mesenchimale.

La tradizionale classificazione clinico-patologica del melanoma, basata sull'originale proposta di Clark e di altri studiosi, compresa l'attuale classificazione WHO, sono state ampiamente criticate.

Innanzitutto, lo schema nosologico tradizionale non si basa esclusivamente su criteri morfologici cito-architetturali.

Infatti, nell'inquadramento dell'istotipo si deve anche prendere in considerazione la sede della lesione (particolarmente per le neoplasie acrali e, in parte, anche per melanomi insorti su sedi foto-esposte).

Un'ulteriore debolezza della classificazione è data dalla scarsa specificità dei reperti morfologici, per cui i diversi istotipi mostrano talora aspetti morfologici sovrapponibili. Per esempio, la risalita pagetoide è caratteristica del SSM, ma si osserva anche nelle fasi avanzate del melanoma su LMM e nell'ALM.

La crescita in *pattern* lentiginoso è simile nella LMM, nell'ALM e nel melanoma

delle mucose, pertanto gli istotipi si possono correttamente distinguere sulla base della sede anatomica e delle modificazioni delle relative strutture anatomiche. Un ulteriore limite della classificazione tradizionale è dato dal fatto che alcune caratteristiche diagnostiche sono relative alla componente non neoplastica, piuttosto che tumorale. Per esempio, modificazioni epidermiche, quali atrofie con perdita della rete *ridges*, sono caratteristiche della LMM, mentre l'ispessimento dell'epidermide si osserva generalmente nel SSM e nell'ALM e si osserva costantemente nel melanoma spitzoide. Inoltre, alterazioni dermiche sono altrettanto rilevanti, soprattutto la presenza di elastosi solare nella LMM. Infine, un'ulteriore critica è rappresentata dal fatto che è possibile osservare più di un istotipo in uno stesso tumore: il melanoma desmoplastico è spesso accompagnato da una componente intra-epidermica tipo LMM, il melanoma nevoide generalmente ha criteri per essere definito NM e, in alcuni casi, mostra aspetti da melanoma spitzoide o da SSM. In generale, la classificazione per istotipi è scarsamente riproducibile tra patologi.

È stato recentemente sottolineato che la tradizionale classificazione morfologica del melanoma ha scarso impatto da un punto di vista clinico e terapeutico, particolarmente in merito alla mancata correlazione tra istotipi e prognosi. Infatti, numerosi studi della letteratura hanno dimostrato che l'istotipo non costituisce un fattore prognostico indipendente, in pazienti affetti da melanoma primitivo con malattia localizzata^{127, 128}. Tuttavia, esistono delle eccezioni; è noto infatti che il melanoma desmoplastico, particolarmente in forma pura, ha un comportamento biologico più assimilabile a quello di un sarcoma che di un melanoma, con più frequente disseminazione per via ematogena, con coinvolgimento polmonare, anziché metastasi linfonodali¹⁴².

Di conseguenza, a causa della bassa frequenza di positività del linfonodo sentinella, in molti Centri non viene effettuata la biopsia del linfonodo sentinella se la diagnosi istologica è quella di melanoma desmoplastico ¹⁴³. Inoltre, a causa della tendenza a sviluppare recidiva locale e alla frequente difficoltà nell'ottenere margini di escissione adeguati, spesso, dopo l'asportazione del tumore, i pazienti affetti da melanoma desmoplastico sono sottoposti a radioterapia post-operatoria ¹⁴⁴. Infine, è noto che la componente intra-epidermica periferica di LMM, ALM e melanoma mucoso è spesso discontinua e poco circoscritta, con una graduale riduzione del numero di melanociti e diminuzione del loro grado di atipia alla periferia della lesione, con modificazioni che tendono a ridursi verso la cute non affetta ¹⁴⁵. Pertanto, in presenza di questi istotipi tumorali può essere difficile stabilire con certezza i margini di escissione chirurgica. Questa informazione (istotipo), insieme ai dati clinici, deve quindi sempre essere considerata con attenzione nella gestione del paziente, specialmente se la neoplasia interessa sedi anatomiche critiche da un punto di vista estetico e funzionale.

Classificazione molecolare

Agli inizi del XXI secolo abbiamo assistito a uno straordinario sviluppo delle applicazioni cliniche delle tecnologie di Biologia molecolare che ha enormemente facilitato la comprensione dei meccanismi patogenetici e molecolari di numerose neoplasie maligne, compreso il melanoma ¹⁴⁶.

Nel 2005, Curtin et al. pubblicarono un lavoro fondamentale, che mostrava la presenza di un'elevata frequenza di mutazioni somatiche oncogene e di amplificazioni in melanomi umani e la loro associazione con la sede anatomica del tumore primitivo e con il grado di fotodanneggiamento. L'attivazione aberrante della via di segnale di MAPK è

stata documentata in oltre l'80% dei melanomi primitivi ¹⁴⁷⁻¹⁵⁰ e specifiche mutazioni di proteine lungo la via RAS-RAF-MEK-ERK oggi sono ritenute mutualmente esclusive ^{136, 148, 149}. Tali mutazioni sono state documentate in tutti gli istotipi di melanoma, compreso il melanoma cutaneo (50% *BRAF*, 15% *NRAS*, fino al 18% *cKIT* in cute cronicamente foto-danneggiata), melanomi mucosi (11% *BRAF*, 5% *NRAS*, 21% *cKIT*) e uveali (50% *GNAQ*) (Tabella 1). Queste mutazioni risultano in effetti complessi biologici pro-oncogenici. L'oncogene *NRAS* tra le varie proprietà, attiva anche la cascata di PI3K. La via di segnale di MAPK può condurre a una proliferazione in cellule trasformate, ma si ritiene che sia anche in grado di indurre un forte arresto della crescita, noto come senescenza, in melanociti normali ¹⁵¹.

Nel 2002, per la prima volta sono state identificate mutazioni somatiche missense di *BRAF* in un numero elevato di neoplasie, che in genere portano a un'attivazione costitutiva di *BRAF* ¹⁴⁷.

Attualmente, sono state identificate più di 75 mutazioni nel gene *BRAF*, le più frequenti sono a livello dell'esone 15. Il 75% di queste rappresentano mutazioni puntiformi del DNA, che causano una singola sostituzione amminoacidica (Valina 600 in Acido Glutammico, V600E) nel prodotto proteico, un ulteriore 20% determina la sostituzione da Valina 600 in Lisina (V600K) e infine il 6% è rappresentato da altri genotipi. I melanomi che mostrano mutazioni di *BRAF* si manifestano in età più giovanile (tali mutazioni si osservano nell'86% dei pazienti di età compresa tra 20 e 30 anni), a livello del tronco o agli arti e associati a un basso danno solare cumulativo (Tabella 1). Mentre lo stato mutazionale di *BRAF* non sembra avere significato prognostico al momento della diagnosi della neoplasia primitiva, evidenze recenti indicano che la mutazione di *BRAF*

si associa a una prognosi più sfavorevole nei pazienti con melanoma metastatico.

Tabella 1. Principali mutazioni somatiche nel melanoma avanzato

Mutazione	Percentuale di melanomi con mutazione	Associazioni fenotipiche
<i>BRAF</i>	50%	<p>Età giovanile Esposizione solare intermittente Tronco, estremità Elevato numero di nevi melanocitici Poche lentiggini Facilità ad abbronzarsi Istotipo melanoma a diffusione superficiale</p>
<i>NRAS</i>	15-20%	<p>Esposizione solare intermittente (debole associazione) Assente o scarsa diffusione pagetoide Circonscrizione periferica</p>
<i>cKIT</i>	2% (10-20% dei melanomi acrali e melanomi mucosali)	<p>Sedi acrale e mucosale Istotipo melanoma acrale-lentiginoso e melanomi mucosali</p>
<i>GNAQ/GNA11</i>	40-50% dei melanomi uveali; melanomi tipo nevi blu	Melanoma uveale

STADIAZIONE

Le nuove linee guida, proposte per la stadiazione del melanoma dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC 8th edition)^{152, 153} sono state stilate sulla base di un'analisi multivariata condotta su 30.946 pazienti con melanoma in stadio I, II e III e su 7.972 pazienti in stadio IV, che modifica e offre maggiori dettagli sui criteri di classificazione TNM e di stadiazione. In particolare nei pazienti con melanoma localizzato, i fattori prognostici dominanti sono lo spessore di Breslow della neoplasia e l'ulcerazione, che sono i criteri primari per definire i melanomi T1b. Tra i 3.307 pazienti con metastasi regionali, i componenti che definiscono la categoria N sono il numero di linfonodi metastatici, la carica neoplastica e l'ulcerazione del melanoma primario. Per la stadiazione, tutti i pazienti con metastasi linfonodali microscopiche sono classificati in stadio III, indipendentemente dall'estensione della carica tumorale. Le micrometastasi rilevate con immunistochimica sono incluse. I due componenti determinanti per definire la categoria M continuano ad essere, in base a un'analisi multivariata dei pazienti con metastasi a distanza, il sito di metastasi e un elevato livello di latticodeidrogenasi nel siero (LDH)^{152, 153} (Tab. 2, 3).

Tab.2 Stadiazione TNM (AJCC)

Classificazione	Spessore (mm)	Stato ulcerativo / mitosi
T		
Tis	NA	NA
T1	≤ 1.00	a: senza ulcerazione e mitosi < 1/mm ² b: con ulcerazione o mitosi ≥ 1/mm ²
T2	1.01-2.00	a: senza ulcerazione b: con ulcerazione
T3	2.01-4.00	a: senza ulcerazione b: con ulcerazione
T4	> 4.00	a: senza ulcerazione b: con ulcerazione
N	N° linfonodi metastatici	Coinvolgimento linfonodale
N0	0	NA
N1	1	a: micrometastasi * b: macrometastasi †
N2	2-3	a: micrometastasi * b: macrometastasi † c: metastasi <i>in transit</i> /satelliti senza linfonodi metastatici
N3	4+ linfonodi metastatici o linfonodi regionali metastatici conglobati o metastasi <i>in transit</i> /satelliti con linfonodi metastatici	
M	Sede	LDH sierico
M0	No metastasi a distanza	NA
M1a	Cute, sottocute o linfonodi a distanza	Normale
M1b	Polmone	Normale
M1c	Visceri	Normale
	Qualsiasi metastasi a distanza	Elevato

* le micrometastasi sono diagnosticate dopo biopsia del linfonodo sentinella.

† le macrometastasi sono definite come metastasi linfonodali rilevate clinicamente e confermate patologicamente.

Balch CM et al. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. J Clin Oncol 2009; 27:6199-206

Tab. 3 Raggruppamento per stadio anatomico del melanoma cutaneo

	Stadiazione clinica*				Stadiazione patologica †					
	T	N	M		T	N	M			
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0			
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0			
IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0			
	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0			
IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0			
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0			
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0			
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0			
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0			
III	Ogni T	N>N0	M0	IIIA	T1-4a	N1a	M0			
					T1-4a	N2a	M0			
					T1-4b	N1a	M0			
				IIIB	T1-4b	N2a	M0			
					T1-4a	N1b	M0			
					T1-4a	N2b	M0			
				IIIC	T1-4a	N2c	M0			
					T1-4b	N1b	M0			
					T1-4b	N2b	M0			
								T1-4b	N2c	M0
								Ogni T	N3	M0
				IV	Ogni T	Ogni N	M1	IV	Ogni T	Ogni N

* la stadiazione clinica comprende la microstadiazione del melanoma primitivo e la valutazione clinica, radiologica delle metastasi.

† la stadiazione patologica comprende la microstadiazione del melanoma primitivo e le informazioni patologiche riguardanti i linfonodi regionali dopo biopsia del linfonodo sentinella o completa linfoadenectomia.

Balch CM et al. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. J Clin Oncol 2009; 27:6199-206.

FATTORI PROGNOSTICI

La sopravvivenza dei pazienti affetti da MM dipende principalmente dallo stadio al momento della diagnosi. Il sistema di stadiazione attuale permette di predire l'andamento clinico nei casi diagnosticati precocemente, tuttavia recenti studi hanno mostrato come anche i cosiddetti melanomi sottili (spessore di Breslow ≤ 1.00 mm), per i quali è riportata una sopravvivenza a dieci anni del 96%, seppur tardivamente, possono andare incontro a processi di metastatizzazione ¹⁵⁴.

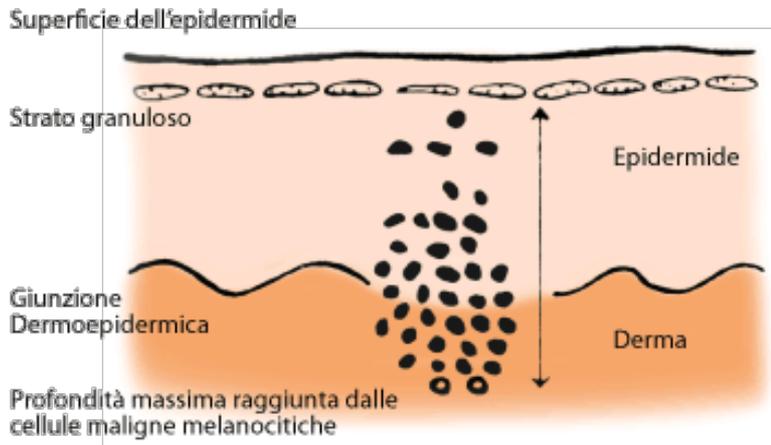
Identificare i pazienti maggiormente a rischio di progressione al momento della stadiazione iniziale è estremamente importante al fine di elaborare un profilo terapeutico specifico e più accurato per ciascun paziente, migliorando conseguentemente anche la prognosi ¹⁵⁵.

Ciò richiede la valutazione dei seguenti fattori prognostici: spessore di Breslow, livello di Clark, ulcerazione, attività mitotica, linfonodo sentinella, linfociti infiltranti il tumore (TILs), marcatori immunoistochimici e sierici.

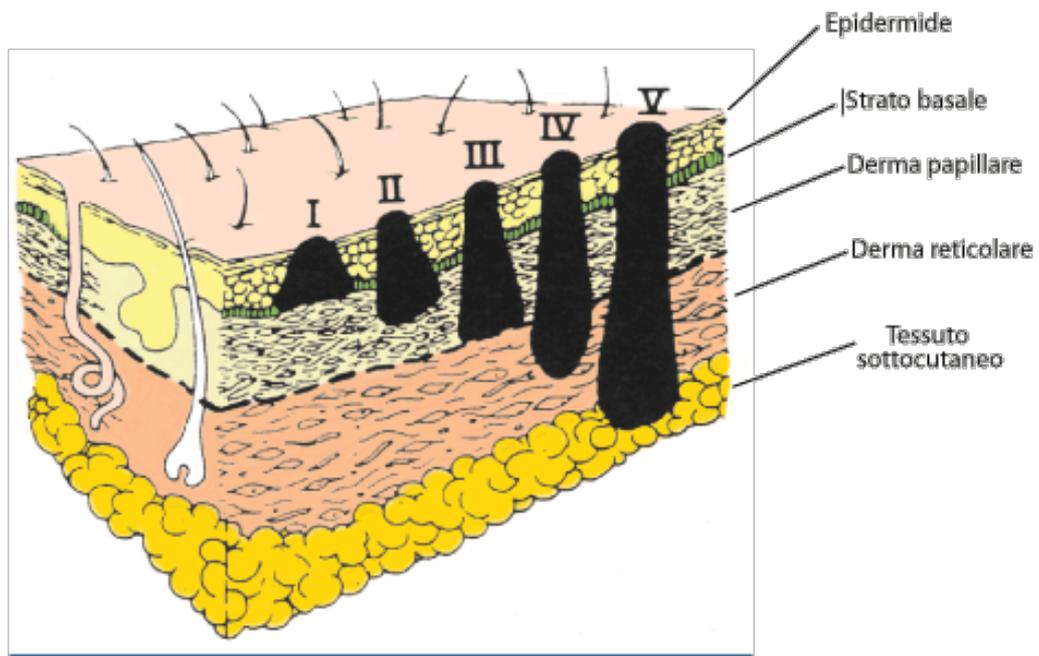
Spessore di Breslow: è la misura mediante oculare micrometrico, espressa in mm, dell'invasività del melanoma. La misura viene effettuata, nella sezione che mostra la maggiore profondità di infiltrazione, a partire dallo strato granuloso (escludendo il corneo che ha spessore variabile nelle varie sedi) in direzione verticale, perpendicolare alla superficie epidermica, fino al punto più profondo della neoplasia. Questo è uno dei fattori prognostici più importanti, in particolare è stata evidenziata una correlazione inversa tra spessore di Breslow e sopravvivenza in pazienti affetti da melanoma ^{152, 153} (Fig.7).

Livello di Clark: consiste nella valutazione dell'infiltrazione nel derma delle cellule melanomatose. Si distinguono cinque livelli. I livello: melanoma confinato al di sopra della membrana basale (epidermide, epiteli follicolari e annessiali), in situ; II livello: invasione discontinua del derma papillare; III livello: invasione massiva del derma papillare fino al confine con il derma reticolare; IV livello: invasione del derma reticolare; V livello: invasione dell'ipoderma. Il livello di invasione di Clark e lo spessore di Breslow tendono generalmente a sovrapporsi, ovvero maggiore è il livello di invasione, maggiore sarà lo spessore del melanoma (Fig.7).

Figura 7



Misurazione dello Spessore di Breslow



Schema dei livelli di Clark

Ulcerazione: la presenza di ulcerazione è stata riconosciuta una variabile prognostica di sicuro impatto e tende a predire una maggiore probabilità di metastatizzare a livello viscerale e osseo. Inoltre è stata inserita dall'AJCC tra i principali fattori prognostici e suddivide ulteriormente tutte le classificazioni secondo lo spessore di Breslow (T1a e T1b, T2a e T2b e così via)^{152, 153}.

Indice mitotico: dati elaborati utilizzando l'AJCC Melanoma Staging Database, hanno mostrato una correlazione statisticamente significativa tra elevato indice mitotico e sopravvivenza globale ($p < 0,0001$). In un'analisi fattoriale condotta su 10.233 pazienti con melanoma localizzato, l'indice mitotico rappresenta il secondo fattore di rilevanza prognostica, subito dopo lo spessore ($\chi^2 79.1$; $p < 0,0001$). Sulla base di questi dati, nel 2010 l'AJCC (Seventh Edition Melanoma Staging System) ha inserito, per la determinazione della stadiazione finale, la valutazione dell'indice mitotico nei melanomi con spessore < 1 mm (T1). In particolare, la presenza di mitosi $\geq 1/\text{mm}^2$ rappresentava un criterio primario, che sostituiva il livello di Clark, per la classificazione T1b del melanoma. Tali pazienti diventavano quindi eleggibili per la metodica del linfonodo sentinella¹⁵⁶. Attualmente tale indice, anche se ancora riportato nei referti istologici, non rappresenta un valore significativo.

Linfonodo sentinella: la biopsia del linfonodo sentinella (LS), introdotta da Morton nel 1992, è ampiamente accettata come metodo di elevata accuratezza diagnostica per l'identificazione anche di micrometastasi, in pazienti affetti da melanoma¹⁵⁷.

Il LS è il primo linfonodo drenante dell'area tumorale che viene identificato mediante

linfoscintigrafia e che presenta un rischio maggiore di metastatizzazione. La positività del LS nel melanoma varia dal 14% al 30% ed è significativamente correlata con lo spessore di Breslow e l'ulcerazione per cui è più frequente negli stadi avanzati ¹⁵⁸.

Linfociti infiltranti il tumore: i linfociti infiltranti il tumore (TILs) possono indurre una regressione spontanea del MM. La presenza di un'intensa infiltrazione linfocitaria intra-tumorale o disposta a banda continua alla base della neoplasia nella sua fase di crescita verticale (Brisk TIL) è considerato un fattore prognostico indipendente dallo spessore, dall'indice mitotico, dall'ulcerazione, dal sesso, dall'età e dal sito in cui esso si è sviluppato ¹⁵⁹.

Marcatori immunoistochimici: l'immunoistochimica (IHC) utilizzata su tessuto incluso in paraffina è una metodica ampiamente validata e consolidata per la caratterizzazione fenotipica di proteine. In particolare, la recente introduzione della tecnologia del "Tissue Micro Array" (TMA) ha permesso l'analisi e l'osservazione concomitante di un'ampia serie di campioni tissutali processati su un unico vetrino, facilitando in tal modo la valutazione di parametri biologici di potenziale valore prognostico. In termini di capacità funzionali, nel MM sono le proteine che facilitano l'invasione e la metastatizzazione quelle che si candidano come validi marcatori di progressione. In particolare, l'aumentata espressione IHC di tre molecole di adesione, quali MCAM/MUC18, L1-CAM e CEACAM-1 si correla ad un intervallo libero da malattia significativamente più breve ¹⁶⁰.

Un altro importante gruppo di molecole, coinvolte nella progressione di tale neoplasia è rappresentato dalle proteine della matrice cellulare.

Tra queste le più significative sono l'osteopontina e la tenascina-C ¹⁶¹, proteine che regolano l'espressione e l'attività delle metallo proteinasi (MMP). Fra le proteinasi, due sono le molecole che, se alterate, sono significativamente correlate alla progressione, l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) e MMP-2 ¹⁶².

Nell'ambito delle proteine legate alla proliferazione cellulare, le più interessanti dal punto di vista prognostico sono il Ki-67, la metallotioneina, il Ku70, il Ku80 e la proteina-2 associata ai microtubuli.

Tra le cicline, solo la ciclina E sembra avere un valore prognostico, anche se questo risultato scaturisce da studi condotti su un limitato numero di pazienti¹⁶³.

I recettori per le chemochine, da CXCR1 a CCR10, sono stati ampiamente studiati nel melanoma; tuttavia dati statisticamente rilevanti sono correlati solo all'iperespressione di CXCR4, proteina che appare associata ad un andamento clinico sfavorevole ¹⁶⁴.

Marcatori sierici: un aumentato livello sierico dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH) rappresenta un fattore prognostico indipendente e significativo di sopravvivenza globale in pazienti affetti da melanoma al IV stadio. In particolare la peggior prognosi è stata osservata in pazienti metastatici con elevato LDH sierico (M1c). Quest'ultimo è un marcatore di particolare utilità negli stadi avanzati della neoplasia, soprattutto in combinazione con l'S100B e il Melanoma-Inhibiting Activity ¹⁶⁵. L'S100B è un biomarcatore descritto per la prima volta a livello tissutale nel 1980 e solo 15 anni più tardi è stato pubblicato il primo studio sul suo significato sierico, in cui si evidenziava un'associazione statisticamente significativa tra aumento sierico del biomarcatore e progressione di malattia confermata successivamente da altre ricerche ¹⁶⁶.

FOLLOW UP

I pazienti affetti da melanoma devono essere sottoposti a regolari controlli clinico-strumentali in base alla stadiazione iniziale. A tutt'oggi non esistono linee guida standardizzate e universalmente concordate, le raccomandazioni del protocollo di follow-up si basano fundamentalmente sia sull'istologia del tumore primario che sullo stadio di malattia.

In base ai criteri del Gruppo Italiano Polidisciplinare sul Melanoma (GIPMe) il follow-up viene eseguito per dieci anni con visite serrate nei primi cinque anni e più distanziate nei restanti anni.

L'esame obiettivo cutaneo è effettuato ad ogni controllo affiancato o meno da esami di laboratorio e strumentali a seconda dello stadio.

Il monitoraggio nel tempo del paziente si avvale di esami ematochimici e in particolare del dosaggio della proteina S100B e dell'LDH che sono correlati con progressione di malattia e tecniche di imaging come: l'ecografia, la radiografia, la tomografia computerizzata (TC), la risonanza magnetica nucleare (RMN) e la tomografia ad emissione di positroni (PET) e PET-TC.

Uno studio di meta-analisi su 10.528 pazienti, eseguito per confrontare l'utilità delle suddette indagini strumentali nella stadiazione dei pazienti affetti da melanoma, conclude che l'ecografia è superiore alle altre metodiche nel rilevare metastasi ai linfonodi, mentre la PET-TC è superiore nel rilevare metastasi a distanza.¹⁶⁹ Tuttavia quest'ultima metodica presenta bassa specificità, con un notevole numero di falsi positivi, per cui nei pazienti a basso rischio di metastasi il suo impiego non è previsto senza precise indicazioni cliniche.

Uno studio del National Institute for Health Research conclude che la PET è utile per la stadiazione dei pazienti con malattia in stadio III e IV, in particolare per lo studio dei tessuti molli, dei linfonodi e delle metastasi viscerali.

TRATTAMENTO CHIRURGICO

Il primo approccio terapeutico di fronte ad una lesione pigmentata sospetta per melanoma è di tipo chirurgico. L'escissione completa della lesione deve comprendere 2 mm di cute sana e il tessuto adiposo sottocutaneo in modo da offrire all'istopatologo la possibilità di effettuare una corretta e completa diagnosi istologica. È indicato estendere l'exeresi fino alla fascia muscolare, che viene generalmente conservata, in quanto non vi sono differenze in termini di recidive locali o a distanza tra la rimozione o conservazione della stessa. L'asportazione di melanomi del letto ungueale o della porzione distale delle dita delle mani o dei piedi, frequentemente necessita della disarticolazione della falange distale o metacarpo-falangea ^{170, 171}.

Successivamente si esegue l'ampliamento della cicatrice chirurgica del pregresso melanoma i cui margini di escissione dipendono dallo spessore del tumore ^{172, 173} (Tabella 4).

La biopsia del linfonodo sentinella è indicata in tutti quei casi in cui lo spessore di Breslow è >1 mm o <1 mm con ulcerazione.

La valutazione del linfonodo sentinella ha permesso di predire con elevata accuratezza (> 95%) lo stato dei linfonodi regionali selezionando così per la linfadenectomia di completamento (LC) solo i pazienti con metastasi linfonodali (circa il 15-20%) ¹⁷⁴.

Tabella 4

Spessore di Breslow	Margini di escissione
In situ	0,5 cm
≤ 2 mm	2 cm
2,01 - 4 mm	2 cm
> 4 mm	2 cm

METASTASI IN TRANSITO

Si definiscono “metastasi in transito” le metastasi che diffondono mediante il sistema linfatico e che si distribuiscono tra la sede della lesione primitiva e la stazione linfatica regionale di drenaggio per quella sede ¹⁷⁵. Il loro trattamento dipende dal numero, dalle dimensioni e dalla sede delle stesse. In presenza di poche metastasi in transito la chirurgia rappresenta il trattamento di scelta ¹⁷⁶.

Tuttavia la maggior parte dei pazienti mostrano lesioni multiple, in tal caso le opzioni terapeutiche sono diverse, in particolare ricordiamo la chemioterapia regionale effettuata con la perfusione ipertermico-antiblastica, l'infusione isolata dell'arto e l'elettrochemioterapia (ECT).

La perfusione ipertermica isolata dell'arto è stata introdotta da Creech et al. ^{177, 178}.

Questi usavano il Melphalan come agente chemioterapico, basandosi su studi in vivo sui topi. L'ipertermia dell'arto è raggiunta grazie al perfusato riscaldato ed alle coperte termiche avvolte intorno all'arto per tutta la durata della procedura. La maggiore differenza tra la chemioterapia sistemica e quella regionale sta nel portare elevate dosi di chemioterapico attraverso un circuito isolato, minimizzando la dispersione sistemica del farmaco e la risultante tossicità. Poiché il tasso di dispersione è $< 1\%$, quando si esegue la perfusione ipertermico-antiblastica con farmaci convenzionali citotossici, esistono pochi effetti collaterali sistemici e la tossicità d'organo è raramente dose limitante. Come risultato, il Melphalan può raggiungere livelli da 10 a 100 volte più elevati nella chemioterapia regionale rispetto a quella sistemica.

La perfusione ipertermico-antiblastica si è dimostrata in grado di ottenere una risposta completa pari al 50%, questo è un fattore prognostico indipendente poiché influenza

sia la sopravvivenza libera da malattia sia quella globale. Successivamente è stato introdotto nella pratica clinica il TNF (“Tumor Necrosis Factor”), che si è dimostrato in grado di produrre un incremento della risposta completa, che mediamente si attesta intorno al 70 %.

Più recentemente, Thompson et al.¹⁷⁹ hanno sviluppato una nuova tecnica definita infusione isolata dell’arto, meno invasiva della perfusione, in quanto viene realizzata mediante cateterizzazione percutanea dell’arto affetto da metastasi in transito. L’agente chemioterapico viene introdotto nel circuito extracorporeo e la circolazione ha la durata di circa 30 minuti. Poiché nel circuito extracorporeo non ci sono lo scambiatore di calore e l’ossigenatore, il trattamento viene condotto in normotermia, in ipossia ed in acidosi. Fattori, questi ultimi due, che possono incrementare l’efficacia del Melphalan¹⁸⁰.

Molti studi clinici recenti hanno proposto l’elettrochemioterapia (ECT) come ulteriore approccio terapeutico per le metastasi in transito. L’ECT si basa sull’elettroporazione, ossia un sistema che aumenta la penetrazione di farmaci nelle cellule tumorali, utilizzando campi elettrici esterni che incrementano la permeabilità delle membrane cellulari^{181, 182}.

Tra i numerosi farmaci, la Bleomicina e il Cisplatino sono stati considerati i più adatti per tale trattamento, in particolare l’esposizione delle cellule all’impulso elettrico incrementa di 80 volte la tossicità del Cisplatino e di 8000 quella della Bleomicina.

Conseguentemente, la regressione del tumore raggiunta con l’ECT con basse dosi di farmaco ridurrebbe al minimo gli effetti collaterali sistemici. L’uso di questa tecnica ha avuto inizio alla fine del 1980 ed è stato dimostrato che è efficace nel trattamento

di metastasi cutanee e sottocutanee, ma non solo, può essere utilizzata anche per metastasi da neoplasie mammarie, sarcoma di Kaposi e carcinoma basocellulare ¹⁸⁴⁻¹⁸⁷.

Lo studio ESOPE (“European Standard Operating Procedures of Electrochemiotherapy”), condotto su 41 pazienti, non solo ha confermato l’efficacia dell’ECT, ma questa procedura è stata testata in accordo al tipo di tumore, al farmaco impiegato (Bleomicina o Cisplatino), alla via di somministrazione venosa o intra-tumorale e al tipo di elettrodo impiegato, al fine di raggiungere una standardizzazione della stessa ¹⁸⁴.

Questo studio ha evidenziato una risposta completa del 73% e una risposta obiettiva nell’85% dei casi, con un controllo locale della malattia a 5 mesi, in circa l’80% dei noduli. Da una revisione degli studi pubblicati finora, risulta che la risposta completa oscilla dal 9% al 100%, mentre la risposta obiettiva varia dal 62% al 100%. Mediamente, la risposta completa è stata del 58% e quella obiettiva dell’86%, entrambe ottenute su 1.351 metastasi trattate. Inoltre, un trattamento effettuato in più sedute può incrementare la percentuale di risposte complete ¹⁸¹.

TRATTAMENTO MEDICO

CHEMIOTERAPIA

La chemioterapia indica l'uso di composti chimici che bloccano la crescita tumorale. Fino a poco tempo fa, lo scopo del trattamento del melanoma metastatico non operabile poteva considerarsi quasi esclusivamente palliativo, dal momento che i chemioterapici a disposizione hanno dimostrato un effetto limitato e non curativo nella maggior parte dei casi.

Gli agenti chemioterapici sono rappresentati da tutte le sostanze chimiche che interferiscono in modo diretto o indiretto con i meccanismi di replicazione del DNA cellulare, in grado di ridurre la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali e delle cellule normali rapidamente o costantemente proliferanti (cellule midollari, mucose, radice capelli, bulbi piliferi). Tuttavia i chemioterapici agiscono su bersagli definiti benché non selettivi, diversamente dai trattamenti mirati. Essi possono danneggiare direttamente il DNA come nel caso degli alchilanti, Platino e derivati, e antibiotici tumorali; interferire o bloccare la sintesi di metaboliti necessari alla replicazione del DNA oppure interagire con la formazione del fuso mitotico e con il citoscheletro cellulare (alcaloidi della Vinca, Taxani).

Gli agenti chemioterapici non agiscono in maniera selettiva solo sulle cellule neoplastiche ma anche sulle cellule sane in replicazione, condizionando così sia le dosi che gli intervalli di somministrazione.

Il melanoma è una tra le neoplasie maggiormente chemioresistenti, ciò si correla sia alla aumentata capacità di espellere gli agenti chemioterapici che penetrano nella cellula che all'elevata capacità di riparare i danni del DNA.

La Dacarbazina è un alchilante che agisce metilando gli acidi nucleici, in particolare il DNA causando rotture dell'elica che portano all'inibizione della sintesi sia di DNA sia di RNA. Inoltre, interagisce con gruppi sulfidrilici, inibendo la sintesi proteica e non è fase specifico. Viene attivato dai microsomi epatici in Mitozolomide attraverso la via del citocromo P450, supera in modesta quantità (nel 15% dei casi) la barriera emato-encefalica con bassa capacità di aggredire le metastasi cerebrali.

La Dacarbazina viene somministrata e.v. alle dosi singole di 850-1000 mg/m² ogni quattro settimane. Studi randomizzati eseguiti negli ultimi dieci anni mostrano percentuali di risposta che variano dal 5% al 12% ^{185, 186}.

La Temozolomide è il metabolita attivo, orale, della Dacarbazina. È una molecola lipofila che attraversa facilmente la barriera emato-encefalica ove raggiunge concentrazioni efficaci contro le metastasi cerebrali. Da alcuni anni è stato individuato un enzima responsabile della maggiore o minore sensibilità al farmaco, si tratta dell'enzima O6 methyl-guanine DNA Methyltransferase (MGMT) che ha un effetto "scudo" sulle cellule tumorali. Studi che riguardano questo enzima hanno dimostrato che più è alto lo stato di metilazione del promoter del gene che codifica per MGMT più sono bassi i livelli di MGMT e quindi maggiore è la risposta alla Temozolomide ¹⁸⁷.

La Temozolomide viene somministrata alla dose di 200 mg/m²/die per 5 giorni ogni 28 per o.s. La somministrazione orale e i minimi effetti collaterali la rendono estremamente maneggevole soprattutto per il trattamento dei pazienti anziani.

La Fotemustina appartiene alla famiglia delle Nitrosuree, è caratterizzata da spiccata lipofilia che ne favorisce il passaggio attraverso la barriera emato-encefalica.

Tale chemioterapico viene somministrato alla dose di 100 mg/m² per via endovenosa, presenta una elevata attività cerebrale e tossicità prevalentemente ematologica ¹⁸⁸.

Diversi studi hanno dimostrato una percentuale di risposte obiettive sia a livello sistemico che cerebrale superiore alla Dacarbazina. I protocolli di combinazione del Platino, Cisplatino e Carboplatino, hanno indotto risposte obiettive nel 15-16% dei casi¹⁸⁹. Tuttavia l'impiego del Cisplatino in monochemioterapia è stato deludente poiché caratterizzato da rare remissioni tumorali complete, generalmente di durata non superiore ai tre mesi; così come per i Taxani (Paclitaxel e Docetaxel), che hanno dato risposte obiettive nel 16-18% dei casi¹⁹⁰.

Data la modesta attività antitumorale della chemioterapia sono stati utilizzati regimi di combinazioni di farmaci singolarmente attivi nell'ambito di studi monoistituzionali ottenendo risposte obiettive nel 30-50% dei casi¹⁹¹. Ricordiamo il regime CVD, (Dacarbazina, Cisplatino e Vinblastina /Vindesina), che ha indotto remissioni obiettive in circa il 35% dei pazienti^{192, 193}.

Citiamo inoltre lo schema terapeutico Dartmouth che consiste nella somministrazione della Dacarbazina e del Cisplatino rispettivamente alle dosi di 220 mg/m² e 25 mg/m² ai giorni 1-3, Carmustina (150 mg/m²) al giorno 1, a cicli alterni da effettuarsi ogni 6 settimane e Tamoxifene (10 mg per o.s. 2 volte al giorno) effettuato ogni 3 settimane¹⁹⁴.

Infine il regime chemioterapico BOLD che è composto dalla Bleomicina, Vincristina, Lomustina e Dacarbazina. La durata del ciclo è di 5 giorni ripetuti ogni sei settimane. L'eventuale allungamento dell'intervallo tra un ciclo e l'altro può essere dovuto alla leucopenia ritardata da Nitrosouree (Lomustina) che in genere insorge alla quarta settimana e può durare fino alla sesta. La polichemioterapia BOLD ha dimostrato dei risultati inizialmente molto interessanti con risposte complessive superiori al 30%. In

uno studio del 1980, condotto su 72 pazienti con melanoma metastatico, 7 hanno mostrato CR (9%), 22 PR (31%), 12 SD (18%) e 31 DP (43%). Nei pazienti che hanno avuto CR, PR o SD l'OS media è stata di 67 settimane, mentre in quelli che hanno avuto DP è stata di 20 settimane. Complessivamente l'OS media dei due gruppi è stata di 31 settimane. In altri lavori si sono osservate risposte complessive intorno al 20% con OS media di 6 mesi ¹⁹⁵.

La maggior parte delle risposte ottenute con la polichemioterapia è risultata di durata breve e per lo più sovrapponibile a quelle ottenute con l'impiego della monochemioterapia, a fronte, tuttavia, di un netto incremento degli effetti collaterali.

IMMUNOTERAPIA

Immunoterapia adiuvante

Diversi studi condotti negli ultimi decenni hanno dimostrato come attualmente nessun trattamento chemioterapico o immunoterapico con modificatori della risposta biologica come l'Interleuchina-2 (IL2) abbia fornito realmente un vantaggio in termini di sopravvivenza nella terapia adiuvante del melanoma.

L'unico modificatore della risposta biologica approvato è l'Interferone (IFN) alfa-2b sulla base dello studio di Kirkwood et al. ¹⁹⁶ che dimostrava un vantaggio sia per quanto riguarda il tempo di sopravvivenza libero da malattia (DFS) che della sopravvivenza globale (OS) nei pazienti trattati con alte dosi di IFN alfa-2b (ECOG 1684) rispetto al braccio di controllo. Diversi studi hanno trattato questo argomento negli anni successivi, in particolare una recente meta-analisi pubblicata da Mocellin et al. ¹⁹⁷ aggiunta

alle precedenti di Wheatley et al.^{199,200} ha mostrato che l'IFN ha un impatto statisticamente significativo nei pazienti con MM ad alto rischio di recidiva, sia sulla DFS, con una riduzione del rischio relativo del 18% (HR: 0,82, CI: 0,77-0,87), sia sull'OS, con una riduzione del rischio relativo dell'11% (HR: 0,89, CI: 0,83-0,96).

Tuttavia, il reale beneficio clinico, le modalità ottimali di trattamento (dose, durata, via di somministrazione), l'entità e la gestione degli effetti collaterali sono ancora oggi tema di controversie, discussioni e limitazioni all'utilizzo clinico.

Anticorpi immunomodulanti

Le nuove strategie terapeutiche includono anticorpi immunomodulanti che antagonizzano il recettore che sopprime la risposta immune come anti-CTLA4 (Ipilimumab) ed anti-PD1 (Nivolumab) o anticorpi che attivano i recettori che amplificano la risposta immune come anti-OX40 e anti-CD40²⁰⁰.

L'Ipilimumab è stato il primo farmaco a dimostrare un vantaggio in termini di sopravvivenza nel melanoma metastatico. Esso è un anticorpo monoclonale IgG1 che blocca il recettore CTLA4 (antigene associato ai linfociti T). CTLA4 è un regolatore negativo dell'attivazione dei linfociti T ne discerne, così, che l'Ipilimumab bloccando il segnale inibitorio di questo recettore, potenzia la risposta immunitaria, mantenendo costante l'attivazione dei linfociti T²⁰¹ (Fig.9).

L'Ipilimumab viene somministrato e.v. al dosaggio di 3 mg/Kg ogni tre settimane per un totale di 4 somministrazioni. Attualmente è indicato per il trattamento del melanoma avanzato.

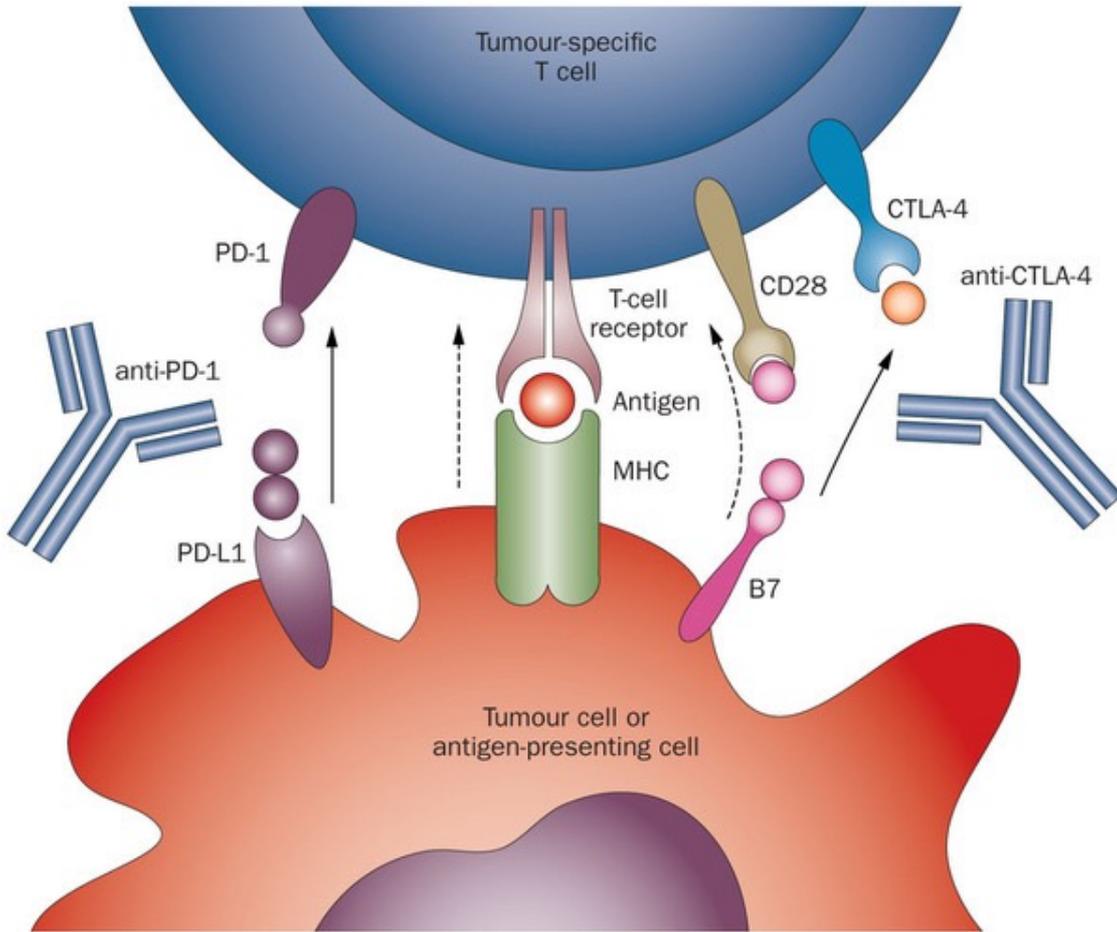
Il Nivolumab è anch'esso un anticorpo monoclonale IgG4, ma anti-PD1, recettore espresso sulle cellule T attivate. Il recettore linfocitario PD1 si lega al PDL-1 espresso

sulle cellule tumorali, inibendo così la risposta immunitaria.

Il Nivolumab impedisce il legame PD1/PDL-1 in modo tale da evocare una risposta immunitaria antitumorale (Fig. 8).

In uno studio di fase I (“A Phase 1b Study of MDX-1106 in Subjects With Advanced or Recurrent Malignancies MDX1106-03”), il Nivolumab è stato somministrato e.v. a dosi comprese fra 0.1 e 10.0 mg per kg di peso corporeo, ogni 3 settimane. La dose utilizzata negli studi successivi è stata solitamente di 3 mg/Kg. Sono stati trattati 304 pazienti con tumore non a piccole cellule del polmone (n=127, squamoso e non-squamoso), melanoma (n=107), carcinoma a cellule renali (n=34), tumore del colon-retto (n=19) o cancro della prostata (n=18). Per quanto riguarda il MM sono state osservate una sopravvivenza globale mediana di 16.8 mesi e un tempo di risposta mediano di 2 anni ²⁰².

Figura 8



TARGET THERAPY

CLASSIFICAZIONE MOLECOLARE DEL MELANOMA

COME PRINCIPIO BASE PER TERAPIE PERSONALIZZATE E TARGET

La *target therapy* rappresenta una terapia mirata “a bersaglio molecolare”, che dovrebbe consentire un trattamento specifico e selettivo di una determinata neoplasia attraverso inibizione/stimolazione di un bersaglio molecolare tipicamente alterato in quella determinata malattia. Almeno teoricamente, una terapia mirata o *target* dovrebbe essere più efficace e meno tossica perché più selettiva, anche se purtroppo non è sempre vero. Il primo esempio di *target therapy* nel melanoma è stato l’Oblimersen, ovvero un oligonucleotide antisense per l’ mRNA del gene *BCL-2*. Purtroppo, i risultati incoraggianti del suo uso nei pazienti affetti da melanoma non sono stati confermati dai successivi studi clinici. Altro esempio “storico” di *target therapy* nel melanoma è il Sorafenib. Tale molecola è un inibitore multichinasico (MTKi), che, oltre ad avere un’azione antiangiogenetica, possiede un effetto inibitorio sulle proteine BRAF e CRAF.

Recentemente, è stato proposto uno schema di classificazione molecolare per il melanoma, che ha associato il livello di esposizione al sole con specifiche alterazioni genetiche e ha definito 4 sottotipi di melanoma. Melanomi associati con l’esposizione intermittente al sole (corrispondenti più o meno a quelli derivanti dalla trasformazione di nevi ed al tipo di melanoma a diffusione superficiale) sono caratterizzati dalla presenza di mutazioni in *BRAF* o *RAS*.

Melanomi insorti su cute esposta cronicamente al sole (più o meno corrispondente alla *lentigo maligna melanoma*) e melanomi originati su cute minimamente esposta al sole

(compresi i melanomi acrali e delle mucose) sono caratterizzati da mutazioni percentualmente maggiori nel gene *c-KIT* e minori in *BRAF/RAS*. Questo modello è potenzialmente attraente in quanto le probabilità di aberrazioni genetiche associate con il melanoma possono essere previste dalla posizione del melanoma primitivo e dal grado di esposizione al sole. Tuttavia, questo modello è inficiato dalla bassa prevalenza di mutazioni in *c-KIT* dei melanomi acrali-lentiginosi e mucosali.

In particolare ricordiamo il Vemurafenib (conosciuto anche come PLX4032 o RG7204) ovvero l'inibitore specifico per la forma mutata BRAF V600E che ha mostrato risposte obiettive nel melanoma avanzato del 50-80%, anche se di durata mediana di 6-7 mesi ^{203, 204}.

Il Dabrafenib è stato il secondo di questa classe di farmaci ad entrare negli studi clinici. Gli studi di fase I/II hanno mostrato un'efficacia pari al Vemurafenib. La tossicità più comune degli inibitori di BRAF è quella cutanea, nello specifico il 26% dei pazienti ha sviluppato il carcinoma squamocellulare o il cheratoacantoma.

I principali inibitori farmacologici di MEK sono il Trametinib e il Selumetinib. MEK è un componente critico della via metabolica delle MAP chinasi, coinvolta nella crescita e sopravvivenza delle cellule cancerose.

Recentemente la Food and drug administration (FDA) ha approvato l'uso del Trametinib e il Dabrafenib in combinazione per i pazienti affetti da melanoma avanzato o non resecabile con mutazione V600K o V600E ²⁰⁵.

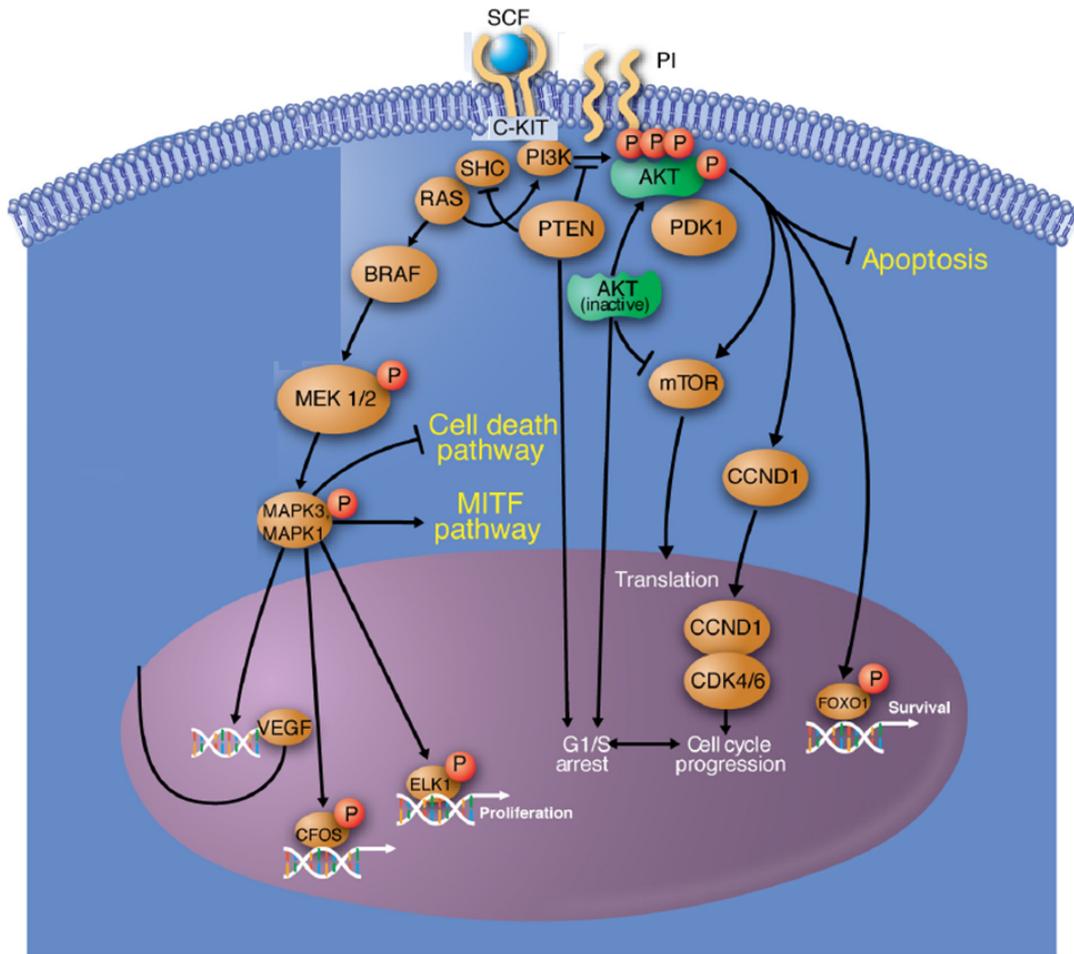
Nel caso di melanomi delle mucose, delle estremità (acrali) e delle aree esposte cronicamente al sole (lentiginosi), è stata dimostrata la presenza di mutazioni del gene *c-*

KIT, che predispongono alla risposta al trattamento con c-KIT inibitori (Imatinib, Nilotinib). Un interessante studio di fase II ha riportato tassi di risposta del 20-30% ed il prolungamento della sopravvivenza libera da progressione con il trattamento con Imatinib ²⁰⁶.

La presenza di diversi pathway coinvolti nella progressione del melanoma fa ipotizzare che è altamente improbabile che una singola via sia sufficiente nel determinare la progressione neoplastica. È invece molto più probabile che più pathway contribuiscano alle differenti caratteristiche delle cellule maligne (sopravvivenza, angiogenesi, blocco apoptotico).

Per tale motivo, le combinazioni di farmaci differenti che agiscono a livello dei diversi pathway rappresentano il futuro della terapia del melanoma.

Figura 9



Valutazione di nuovi fattori prognostici

Come è noto il melanoma maligno cutaneo (MM) è una delle forme più frequenti e aggressive di neoplasie cutanee che si verifica in tutte le fasce di età (Cossu et al., 2016) e i fattori di rischio associati allo sviluppo di esso sono multifattoriali: fattori genetici e ambientali che giocano un ruolo nella sua patogenesi (Garbe e Leiter, 2009; Cossu et al., 2016). Gli studi epidemiologici hanno identificato fattori di rischio comprendenti alterazione della regolazione dei geni di suscettibilità (ad esempio CDKN2A, CDK4, MC1R, ATM e MX2), una storia familiare di melanoma, colore dei capelli e della cute e esposizione alla luce UV. (Holick, 2003; Nejentsev et al., 2004; Uitterlinden et al., 2004; Deeb et al., 2007; Casula et al., 2009; Welsh, 2011; Colombino et al., 2013, 2014; Pena-Chilet et al., 2013). L'esposizione ripetuta al sole durante l'infanzia o l'adolescenza è associata a un aumentato rischio di melanoma; tuttavia, il MM può anche presentarsi in aree non esposte al sole, anche con esiti diversi (Garbe e Leiter, 2009). La sua incidenza è aumentata notevolmente in tutto il mondo; in particolare, l'incidenza del melanoma continua ad aumentare nelle popolazioni bianche indipendentemente dai tentativi di migliorare la protezione solare, sottolineando la necessità di ulteriori misure e trattamenti preventivi (Linos et al., 2009; Rigel, 2010). Per tali motivi, negli ultimi anni, l'attenzione è stata focalizzata sul possibile ruolo della vitamina D nella riduzione del rischio di neoplasie e, in particolare, sul rischio di melanoma. Alcuni studi suggeriscono un ruolo protettivo della vitamina D nel melanoma, mentre i risultati sulla relazione tra assunzione dietetica di vitamina D e rischio sono controversi e non vi sono prove sufficienti per suggerire che l'integrazione di vitamina D diminuisca il rischio di

melanoma. La relazione tra vitamina D e melanoma sembra essere più complessa rispetto ad altri tumori (Uitterlinden et al., 2004). Nei melanomi non correlati all'esposizione solare, l'immunosoppressione sistemica e altri aspetti fisiologici possono influenzare l'insorgenza della malattia. Una diminuzione dei livelli di vitamina D può avere un ruolo fondamentale in questi pazienti ed è stato riportato che livelli più elevati di vitamina D circolanti sono associati a una prognosi migliore nei pazienti con melanoma (Ahn et al., 2010; Zhao et al., 2014).

Biosintesi Vitamina D

La vitamina D è un micronutriente liposolubile, che svolge un ruolo nel mantenimento dell'omeostasi del calcio e del fosfato, aumentando prevalentemente l'assorbimento intestinale di calcio e fosfato. La vitamina D deriva da due fonti: endogene (circa il 90% dalla sintesi della pelle - vitamina D₃) ed esogene [dietetiche o supplementi - vitamine D₂ e D₃ per il restante 10%]. Il substrato, 7-deidrocolesterolo (7-DHC), penultimo composto nella via di sintesi del colesterolo, si accumula nell'epidermide (Deeb et al., 2007; Pena-Chilet et al., 2013). La radiazione UVB sulla cute trasforma 7-DHC nella previtamina D₃, che subisce l'isomerizzazione non enzimatica per formare la vitamina D₃ (Figura 2). La vitamina D₃ viene trasferita nel flusso sanguigno dalla proteina legante la vitamina D, una globulina α che ha un'alta affinità per la vitamina D e i suoi metaboliti. Per essere fisiologicamente attiva, la vitamina D (o D₂ o D₃) deve prima essere idrossilata in 25-idrossivitamina D (25-OHD), prevalentemente nel fegato (Fig. 2 e 3) (Spina et al., 2006). Quindi, la 25-OHD viene successivamente idrossilata in 1 α , 25-diidrossivitamina D [1,25 (OH) 2D₃] o calcitriolo (forma attiva di vitamina D),

prevalentemente nei reni, anche se molti tessuti (compresa la cute) possiedono la capacità di produrre $1\alpha, 25\text{-OHD}$ (Figure 2 e 3) (Spina et al., 2006). Infatti, l'intera via metabolica può essere dimostrata a livello della cute irradiata con UVB e la $1,25\text{ (OH) }2\text{D}_3$ può essere prodotta entro 16 ore. In breve, la vitamina D è principalmente sintetizzata nella cute esposta al sole, dove la radiazione UV B (280-320 nm) induce la fotolisi dell'anello B in 7-DHC. A partire dal substrato 7-DHC, viene generata una cascata di composti: la previtamina D₃ alla vitamina D₃, che a sua volta viene trasformata in 25-OHD e, infine, $1,25\text{ (OH) }2\text{D}_3$. I fototipi cutanei e la dose UVB influenzano i livelli di vitamina D (Parkin, 2011).

Attività biologica

Il ruolo primario della vitamina D comporta la regolazione del metabolismo osseo e dell'omeostasi del calcio-fosforo. Tuttavia, negli ultimi due decenni, numerosi studi in vitro e in vivo hanno evidenziato diversi effetti "non calcemici" o "extrascheletrici" della vitamina D (Holick, 2005). Livelli ridotti di vitamina D influenzano l'insorgenza e la progressione di diverse malattie come malattie autoimmuni, infezioni respiratorie, diabete mellito di tipo 1 e 2, ipertensione e malattie cardiovascolari, disturbi neuromuscolari e cancro (Holick e Chen, 2008). Gli effetti della vitamina D sono in gran parte correlati alla presenza e all'attività del recettore nucleare della vitamina D (VDR). Infatti, per esercitare le sue funzioni biologiche, $1,25\text{ (OH) }2\text{D}_3$ si lega al VDR ed eterodimerizza con il recettore del retinoide X (Spina et al., 2006). Il complesso eterodimerico interagisce nel nucleo con sequenze specifiche nella regione del promotore di geni responsivi alla vitamina D, noto come l'elemento responsivo alla vitamina D (VDRE) (Spina et al., 2006). Inoltre, regola l'espressione di oltre 900 geni, tra cui i

geni della progressione del ciclo cellulare, della differenziazione e dell'apoptosi (Valverde et al., 1995; Bonilla et al., 2005; Graf et al., 2005; Lamason et al., 2005). Queste attività biologiche suggeriscono che alti livelli di metaboliti di vitamina D possono essere protettivi contro il cancro (Deeb et al., 2007). Il calcitriolo esercita una significativa attività antitumorale in vitro e in vivo nel carcinoma a cellule squamose murine (SCC), nei modelli di adenocarcinoma prostatico metastatico di ratto, nell'adenocarcinoma prostatico umano (PC-3 e LNCaP), nella mammella, nel colon e nel pancreas, così come nella leucemia, mieloma e linfoma (Holick, 2004). In effetti, il calcitriolo regola multiple vie di segnale coinvolte nella proliferazione, apoptosi, differenziazione e angiogenesi e pertanto ha il potenziale effetto di influenzare lo sviluppo e la crescita del cancro (Holick, 2007; Weinstein et al., 2015).

Numerosi effetti della 1,25 (OH) 2D3 includono anche il miglioramento dei processi di riparazione del DNA, la difesa contro specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'immunomodulazione (Rass e Reichrath, 2008; Reichrath e Reichrath, 2012). Nonostante le sue proprietà antiproliferative, l'uso di 1,25 (OH) 2D3 come agente terapeutico è limitato a causa dei suoi effetti ipercalcemici. Tuttavia, la riduzione o l'eliminazione della catena laterale del colesterolo riducono significativamente o abolisce gli effetti calcemici; inoltre, un certo numero di analoghi della vitamina D3 sono stati sintetizzati, con l'attività clinica di molti di questi ancora oggetto di studio, sia come agenti singoli sia in combinazione con altri farmaci (Rochel et al., 2001).

Poiché VDR è presente nella maggior parte delle cellule del corpo e il calcitriolo regola il 3-5% del genoma umano, l'attività della vitamina D è ampia e può alterare le difese del corpo umano e molto probabilmente limiterà la progressione di più malattie, incluse

le neoplasie (Fig. 3) (Stumpf et al., 1979; Spina et al., 2006). Tra i molti geni indotti dal calcitriolo, il CYP24A1 (noto anche come 24-idrossilasi) è particolarmente importante; codifica l'enzima che catalizza la degradazione sia di 1,25 (OH) 2D3 (calcitriolo) sia di 25 (OH) D3 (Prosser e Jones, 2004). Pertanto, l'attività della vitamina D è auto-regolata in quanto può indurre la propria inattivazione.

Livelli di Vitamina D

Le radiazioni UV sono il principale fattore ambientale coinvolto nello sviluppo delle neoplasie cutanee in generale e del melanoma, in particolare. La sintesi della melanina nella cute rappresenta un meccanismo protettivo naturale contro il danno indotto dai raggi UV e la carcinogenesi, ma limita anche la sintesi della vitamina D3. La carenza di vitamina D è un problema mondiale, con livelli insufficienti di vitamina D che aumentano il rischio di sviluppare obesità, diabete, asma, disturbi autoimmuni, malattie infettive e alcuni tipi di neoplasie. Diverse meta-analisi supportano l'evidenza che i bassi livelli di 25-idrossi-vitamina D3 sono un fattore di rischio per molte malattie croniche incluse le neoplasie (Guerrieri-Gonzaga e Gandini, 2013). Si è suggerito che il livello sierico minimo desiderabile di 25-idrossivitamina D3 sia compreso tra 20 e 30 ng / ml (Norman et al., 2007). Nel 2011, il comitato dell'Istituto di Medicina (Washington, DC, USA) ha riportato delle linee guida che affermano che un livello di 25-idrossivitamina D3 superiore a 20 ng / ml è necessario per una buona salute ossea in generale per quasi tutti gli individui (Ross et al., 2011). Tuttavia, il rapporto dell'Istituto di Medicina non ha preso in considerazione le variabili cliniche e demografiche (razza / etnia, composizione corporea, esposizione solare).

Recentemente, una meta-analisi di undici studi prospettici di coorte suggerisce che

sono necessarie le concentrazioni ottimali di 25-idrossivitamina D3 tra 30 e 40 ng / ml (75 e 100 nmol / l) per ridurre la mortalità (Zittermann et al., 2012). Tuttavia, il ruolo della vitamina D nel rischio di insorgenza di neoplasie cutanee è difficile da valutare in quanto i livelli sierici di 25-OHD, così come l'assunzione di vitamina D, sono molto diversi da un paese all'altro dal Nord al Sud Europa. Inoltre, i metodi di analisi utilizzati per misurare i livelli nel siero di 25 (OH) D3 non sono standardizzati e possono dare risultati variabili. Questo deve essere preso in considerazione quando si interpreta la correlazione tra vitamina D e patologia. Un aspetto importante è quanta esposizione alla luce solare è necessaria per produrre livelli sufficienti di 25- (OH) D3 circolanti per uno stato di salute ottimale e se questo può essere ottenuto senza gli effetti deleteri di un'eccessiva esposizione alla luce solare (come le neoplasie cutanee) o se l'integrazione nutrizionale è necessaria. Diverse variabili relative a ciascun individuo (costituzione genetica, tipo di cute, area della cute esposta al sole, abbigliamento, abitudini di vita) e fattori ambientali che influenzano l'intensità e l'intervallo spettrale di UVB (come latitudine, stagione e strato di ozono) possono essere influenti (Spina et al., 2006). Sono state elaborate linee guida per l'esposizione alla luce solare personale per raggiungere livelli desiderabili di vitamina D (Holick et al., 2011). La 25-OHD è la principale forma circolante di vitamina D e, di conseguenza, viene utilizzata per determinare lo stato di vitamina D di bambini e adulti. Le linee guida pratiche della "Endocrine Society" raccomandano che i bambini di età pari o superiore a 1 anno ricevano 600-1000 UI al giorno e gli adulti ricevano 1500-2000 UI al giorno, con la raccomandazione che le persone obese ne richiedano 2-3 volte di più (Holick et al., 2011).

Esposizione solare e melanoma

Il rischio di melanoma è associato ai fototipi (I, II e III nell'Europa settentrionale e nei tipi III, IV nelle popolazioni dell'Europa centrale) e al gradiente della radiazione annuale di UVB-UVA. La Scandinavia è situata alle latitudini ($> 54^\circ \text{N}$) dove le esposizioni annuali UVB (280-315 nm) sono moderate e solo nell'ordine del 25% delle esposizioni equivalenti agli UVB (Moan e Dahlback, 1995). Ciononostante, il MM rappresenta un grave problema di salute in Scandinavia. Nel 2008, il tasso stimato di incidenza di età del MM per le donne in Norvegia era 16,5, contro 8,9 in Francia, 5,6 in Spagna, 8,7 in Italia e 12,6 in Germania (Ferlay et al., 2010).

La relazione tra esposizione annuale alla radiazione solare (ponderata utilizzando lo spettro di azione dell'eritema CIE) e tassi di incidenza del carcinoma a cellule basali (BCC), SCC e MM per Scandinavia, Inghilterra, Nuova Zelanda e Australia analizzati utilizzando le funzioni logaritmiche è simile per quanto riguarda i vari fototipi cutanei (Moan et al., 2008). Per gli epitelomi SCC e BCC, il rischio di malattia è simile per uomini e donne, mentre per il MM, il tasso di incidenza è significativamente più alto per gli uomini che per le donne. La ragione di questa differenza di sesso è dovuta al fatto che le donne del Nord Europa, della Nuova Zelanda e dell'Australia tendono ad esporsi a intermittenza a dosi elevate durante le vacanze estive rispetto agli uomini, che hanno modelli di esposizione più bassi (Moan et al., 1990, 2013).

Gli individui con la cute scura e africana (tipi V-VI) hanno un rischio 20 volte inferiore di sviluppare tumori della pelle rispetto agli individui bianchi che vivono alla stessa latitudine (Wu et al., 2011). Gli individui di colore che vivono vicino all'equatore e esposti alla luce solare ogni giorno hanno livelli ematici di 25 (OH) D di 40-60 ng / ml.

La loro cute è stata progettata per produrre un'adeguata quantità di vitamina e la pigmentazione della melanina previene gli effetti dannosi, riducendo al minimo il rischio di non melanoma skin cancer (NMSC). Gli asiatici hanno invece un rischio intermedio (Wu et al., 2011). Una recente indagine mostra che la mortalità dei MM diminuisce con la diminuzione della latitudine in Europa nel suo insieme (Spina et al., 2006; Shipman et al., 2011; Moan et al., 2013).

In sintesi, le prove che il melanoma è causato dall'esposizione solare provengono da dati epidemiologici che mostrano che l'incidenza del melanoma è più elevata quando gli individui con cute chiara (sensibili alle scottature solari) vivono a basse latitudini. Inoltre, tra questi il rischio è più alto per coloro che riferiscono scottature e esposizioni solari durante le vacanze. La relazione tra esposizione al sole e rischio di melanoma è, tuttavia, complessa. Nel complesso, i dati genetico-epidemiologici suggeriscono che l'esposizione al sole intermittente e le scottature solari sono fattori che sono responsabili del marcato aumento dell'incidenza del melanoma.

Fattori che influenzano la produzione di Vitamina D

Durante l'esposizione alla luce solare, le radiazioni UVB penetrano nella cute e attivano reazioni per la produzione di previtamina D3. Gli UVB inviano segnali ai melanociti per aumentare la sintesi di melanina. La melanina agisce come una protezione solare naturale ed è efficacemente “impacchettata” in melanosomi che migrano verso l'alto fino agli strati superiori dell'epidermide, dove assorbono efficacemente le radiazioni

UVB e UVA. Un aumento della pigmentazione cutanea è inversamente correlato al numero di fotoni UVB che possono penetrare nell'epidermide e nel derma. Pertanto, l'efficienza nell'utilizzo dei fotoni UVB per produrre vitamina D3 nella cute è inversamente correlata alla quantità di pigmentazione cutanea. Un individuo con pigmentazione profonda della cute di origine africana (fototipo 5), che è esposto alla stessa quantità di luce solare di un individuo con pigmentazione cutanea minima di origine celtica o scandinava (fototipo 2), produrrà meno vitamina D3 rispetto a quello prodotto negli individui con la cute più chiara (Weinstein et al., 2015). L'invecchiamento causa una diminuzione della quantità di 7-DHC nell'epidermide; gli anziani esposti alla stessa quantità di luce solare di un giovane adulto produrranno una quantità inferiore di vitamina D rispetto a un giovane adulto (Weinstein et al., 2015). L'angolazione con cui la luce solare penetra nell'atmosfera terrestre influenza anche la produzione di vitamina D nella cute, questo è relativo alla stagione, all'ora del giorno e alla latitudine. A latitudini molto elevate, come in Norvegia e in Canada, si produce poca vitamina D tra i mesi di Ottobre e Marzo. Per risolvere il problema di queste variabili associate alla sintesi di vitamina D indotta dal sole tra cui ora del giorno, copertura nuvolosa, stagione, latitudine e tipo di pelle, è stata sviluppata un'applicazione gratuita che fornisce all'utente non solo informazioni utili su quanta vitamina D viene prodotto ma avverte anche quando sono a rischio di sovraesposizione alla luce solare. In alcune circostanze, l'incremento con l'alimentazione può essere necessario e forse preferibile alla luce solare.

Vitamina D e neoplasie

Studi epidemiologici hanno riportato che gli individui che vivono a latitudini più elevate corrono un rischio più elevato di sviluppare neoplasie alla mammella, al colon, alle ovaie e alla prostata; infatti, i tassi di mortalità sia negli uomini che nelle donne sono stati correlati alla loro esposizione alla luce solare (Grant, 2002). Diverse segnalazioni hanno indicato che alcuni dei tumori più comuni erano significativamente ridotti negli individui con livelli circolanti più alti dell'ormone antiproliferativo 25 (OH) D, e che un'integrazione adeguata di vitamina D e un'esposizione solare ragionevole sono tra i fattori di prima linea nella profilassi per un ampio spettro di tumori (Pludowski et al., 2013). Infatti, l'aumento dei livelli di 25 (OH) D è stato trovato prevenire alcuni tumori attraverso la downregulation della crescita cellulare (Stumpf et al., 1979; Spina et al., 2006). Tuttavia, è stato difficile capire come l'aumento dell'esposizione alla luce solare potrebbe aiutare a ridurre il rischio di tumori comuni, poiché è noto che qualsiasi aumento significativo dell'assunzione di vitamina D o esposizione alla luce solare non aumenta i livelli ematici di 1,25 (OH) D. Alcuni indizi sui possibili meccanismi patogenetici sono stati forniti dalle osservazioni che le cellule normali e tumorali della prostata possono esprimere un enzima funzionale 1-OHase simile a quello rilevato a livello cutaneo (Schwartz et al., 1998). Dall'osservazione iniziale, è ora riconosciuto che le cellule normali e tumorali nel colon, seno e altri tipi di tessuto possiedono un meccanismo enzimatico per convertire 25 (OH) D direttamente in 1,25 (OH) 2D (Spina et al., 2006). La produzione di 1,25 (OH) 2D in più punti può essere necessaria per mantenere e regolare i geni coinvolti nel controllo della crescita e della sopravvivenza delle cellule e per impedire alle cellule di mutare.

Studi osservazionali sui livelli di Vitamina D e melanoma

I risultati riguardanti la relazione tra livelli di vitamina D e il rischio di melanoma sono controversi. In pochi studi si è valutato la vitamina D nel siero prima dello sviluppo del melanoma, nella maggior parte si è tenuto in considerazione la vitamina D sierica al momento della diagnosi. In altri studi, lo stato della vitamina D al momento della diagnosi è stato valutato e i pazienti sono stati seguiti per la sopravvivenza. Gli studi epidemiologici progettati per esaminare il rischio associato ai livelli di vitamina D nel siero presentano molte limitazioni, incluso il fatto che i livelli probabilmente cambiano nel tempo. Inoltre, non è chiaro quale sia la misura più rilevante (vitamina D media per un periodo o il livello più basso di vitamina D) per indicare il periodo più critico. Major et al. (2012) hanno condotto il primo studio prospettico per valutare la relazione tra le concentrazioni di vitamina D nel siero e il conseguente rischio di melanoma. I risultati di questo studio non indicano un'associazione statisticamente significativa tra i livelli sierici di 25- (OH) D e il melanoma, sebbene vi sia un'associazione protettiva suggerita nel secondo quartile rispetto ai livelli più bassi (Major et al., 2012). In altri studi, lo spessore di Breslow più profondo o lo stadio più elevato era associato a una minore vitamina D del siero o entrambi (Newton-Bishop et al., 2009; Nürnberg et al., 2009; Gambichler et al., 2012). Newton-Bishop et al., (2009) hanno mostrato che i livelli sierici di 25-idrossivitamina D₃ erano inversamente correlati allo spessore della neoplasia tra 941 pazienti con melanoma, sebbene non vi fosse differenza nei livelli sierici di vitamina D tra i controlli sani (n = 114) e i pazienti. Un altro studio non ha mostrato alcuna relazione diretta tra livelli elevati o bassi di vitamina D e l'insorgenza e la gravità del melanoma (Garland et al., 2003). Al contrario, Nürnberg et al. (2009) hanno evi-

denziato che tra i pazienti con MM, sono stati trovati livelli sierici di 25 (OH) D significativamente ridotti nei pazienti in stadio IV rispetto ai pazienti in stadio I e quelli con livelli sierici bassi di 25- (OH) D (< 10 ng / ml) probabilmente sviluppa una malattia metastatica a distanza ravvicinata rispetto a quelli con livelli sierici di 25 (OH) D più alti (> 20 ng / ml).

Poiché studi epidemiologici hanno riportato risultati incerti e a causa delle difficoltà nella valutazione del rischio di melanoma in risposta ai livelli sierici di vitamina D, le successive indagini sono state indirizzate verso lo studio del recettore VDR e la sua espressione nei melanociti. Pertanto, in studi recenti, i polimorfismi dei geni VDR (che sono spesso sovraespressi nelle cellule di melanoma) sono associati all'insorgenza di diversi tumori incluso il melanoma (Maruyama et al., 2006; Hou et al., 2015).

Recettore della Vitamina D

Il gene più studiato nel pathway della vitamina D è il gene VDR localizzato sul cromosoma 12q13.11. Il gene ha 11 esoni, con più di 600 polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) che sono stati identificati nella sua regione codificante. Questo recettore è un fattore di trascrizione nucleare che appartiene alla superfamiglia dei recettori degli ormoni steroidei. Il VDR media i principali effetti cellulari della vitamina D. L'ormone attivo 1,25 (OH) 2D3, legandosi a VDR, regola varie vie di segnalazione coinvolte nella progressione del ciclo cellulare, nella differenziazione e nell'apoptosi, implicate anche nello sviluppo e nella progressione del cancro (Welsh, 2011). Molti studi epidemiologici hanno valutato associazioni tra varianti VDR e vari tipi di neoplasie, compresi quelli della mammella, della regione coloretale, dell'ovaio e della prostata (Maruyama et al., 2006). Allo stesso modo, sono note le associazioni di polimorfismi VDR

con rischio di neoplasie cutanee. Molti studi epidemiologici hanno anche esaminato le associazioni tra le varianti VDR e il rischio di melanoma. Tuttavia, i risultati di questi studi non sono stati coerenti. Solo pochi SNP, considerati funzionali, si presentano ad alta frequenza nelle popolazioni bianche e possono influenzare l'affinità del recettore, il legame con il DNA nucleare, la trascrizione dell'RNA e la sintesi proteica (Uitterlinden et al., 2004). Un recente studio dei polimorfismi del VDR inclusi Fok1, Bsm1, Apa1 e Taq1 è stato effettuato per definire i ruoli dei polimorfismi nel rischio, nell'incidenza e nello sviluppo delle neoplasie della cute. I risultati di questo studio mostrano che il polimorfismo di Fok1 è associato a un rischio significativamente maggiore di tumori della cute (Zhao et al., 2014). Il polimorfismo Taq1 potrebbe contribuire alla suscettibilità ai NMSC. Nessuna associazione significativa è stata osservata tra il polimorfismo di Bsm1 e il rischio di svilupparli. Uno studio di meta-analisi mostra che Fok1, Taq1 e Apa1 possono essere i biomarker di suscettibilità per i tumori cutanei (Zhao et al., 2014).

VDR e gene p53

Le vie di segnale del VDR e p53 regolano molte funzioni cellulari che sono rilevanti per lo sviluppo delle neoplasie, tra cui la proliferazione, la differenziazione, l'apoptosi e la sopravvivenza cellulare; di conseguenza, hanno un ruolo importante sulla trasformazione maligna delle cellule (Maruyama et al., 2006). Inoltre, i geni VDR e p53 rappresentano due importanti soppressori tumorali in diversi tessuti (Evans et al., 1998; Pálmer et al., 2004). Le mutazioni nei geni che codificano le proteine del pathway p53 rappresentano un segno distintivo di molti se non di tutti i tipi di neoplasie. Gran parte

della funzione tumore-soppressiva nella cute può essere mediata attraverso l'interazione delle vie VDR e p53, sia per attivazione reciproca che per inibizione (Maruyama et al., 2006). Le radiazioni UV inducono diverse forme di lesioni a livello del DNA, che hanno la capacità di modulare l'equilibrio cellulare, generando così ROS (Reichrath e Reichrath, 2012). Sia il danno indotto da UV che il danno da ROS attivano p53. L'irradiazione UV induce la p53 a stimolare la pigmentazione della cute mediante derivati pro-opiomelanocortinici, tra cui l'ormone α -melanocitico stimolante che l'ormone adrenocorticotropo, riducendo la sintesi cutanea di vitamina D (Gupta et al., 2007). Le cellule tumorali contengono spesso abbondanti proteine mutanti p53 (mutp53), che possono contribuire attivamente alla progressione del tumore mediante un meccanismo di guadagno di funzione. L'elemento di risposta VDR è stato identificato come sovra-rappresentato nelle sequenze del promotore legate da mutp53. Stambolsky et al. (2010) hanno riferito che mutp53 può interagire funzionalmente e fisicamente con VDR. Mutp53 è reclutato in geni regolati da VDR, aumentando la transattivazione di alcuni geni o diminuendo l'espressione di altri. Inoltre, mutp53 aumenta l'accumulo nucleare di VDR e converte la vitamina D in un agente antiapoptotico. Pertanto, lo stato di p53 può influire sull'impatto biologico della vitamina D sulle cellule tumorali e dovrebbe essere esaminato quando si considerano analoghi della vitamina D come terapia antitumorale.

MATERIALI E METODI

La vitamina D gioca un ruolo fondamentale nell'omeostasi del calcio, nell'attività muscolare, nella neuroprotezione, nella prevenzione delle malattie cardiovascolari e nelle neoplasie. Circa il 20% di tutti i casi di tumori sono correlati all'obesità. Si ritiene che la vitamina D sia uno dei fattori implicati in questa associazione. Tuttavia, la relazione con il melanoma (MM) è complessa a causa dell'influenza dell'esposizione solare. Infatti, sebbene siano richiesti i raggi UV di tipo B per produrre vitamina D, essi sono anche considerati uno dei più importanti fattori di rischio per i melanomi e i non melanoma skin cancer (NMSC). Il MM è una delle più letali neoplasie della cute, che può colpire qualsiasi età. La sua incidenza è aumentata nonostante gli sforzi per migliorare la protezione solare, mettendo in evidenza la necessità di misure preventive addizionali e trattamenti. L'esposizione solare intermittente e le scottature sono fortemente correlate con la comparsa di un MM, comunque il MM può anche svilupparsi in aree non fotoesposte, dove (molto probabilmente) altri pathway biologici potrebbero causare la patologia, con anche differenti risultati.^{206,207} A questo riguardo, la lentigo maligna melanoma (LMM) può essere usata come modello di MM nelle aree con esposizione cronica al sole, essa è caratterizzata da una buona prognosi, dopo l'escissione chirurgica della neoplasia.²⁰⁸ Se le sedi anatomiche sono soggette all'esposizione intermittente la prognosi benigna può cambiare e diminuire. La vitamina D è il precursore di un ormone (1,25-diidrossivitamina D3), che ha molti effetti biologici sulla cute (per esempio la regolazione della crescita cellulare e un ruolo centrale nel sistema immune). Le condizioni normali sono determinate dall'esposizione solare, che rappresentano oltre il 90% della richiesta della vitamina D,

mentre la dieta contribuisce a circa il 10%.²⁰⁹ Gli effetti antineoplastici della vitamina D sono stati documentati in differenti neoplasie sistemiche, come quella della mammella, della prostata e del colon, e poi in differenti linee cellulari del melanoma esprimenti il recettore nucleare della vitamina D (VDR); infatti è stata valutata una progressiva riduzione dell'espressione del VDR dai nevi al MM.^{210, 211} Comunque la relazione tra vitamina D e MM è più complessa, confrontata con altre neoplasie sistemiche.²¹² Infatti è ben stabilito che la radiazione UV non è tra le cause principali di melanomi nelle sedi non esposte al sole, dove invece l'immunosoppressione sistemica, le caratteristiche anatomiche e fisiologiche in questi siti speciali, potrebbero contribuire allo sviluppo della patologia, mostrando anche come un decremento nei livelli circolanti di vitamina D potrebbe giocare un ruolo fondamentale in questa classe di pazienti.²¹³ Infatti in letteratura è stato riportato che alti livelli sierici di vitamina D sono associati con una migliore prognosi nei pazienti con melanoma²¹⁴; comunque evidenze certe sui livelli sierici nei pazienti con melanoma in aree fotoesposte e non fotoesposte sono ancora mancanti.

Analisi retrospettiva

Abbiamo eseguito un'analisi retrospettiva dei pazienti affetti da melanoma seguiti presso il nostro ambulatorio di Dermatologia oncologica da Dicembre 2015 a Dicembre 2018 per identificare pazienti con melanoma in zone fotoesposte (NST-MM) e non fotoesposte (NST-MM). Abbiamo incluso nei NST-MM i MM della pianta del piede, del palmo della mano, dei glutei e della cute dei genitali. Altri siti anatomici erano inclusi nei NST-MM, per quanto riguarda i pazienti con MM comparso nelle aree con esposizione intermittente al sole (tronco, arti superiori e inferiori) erano inclusi in NST-

MM. I dati clinici e patologici erano stati ottenuti dal nostro database elettronico. I seguenti parametri erano stati raggruppati e analizzati: sesso (femmine e maschi), età (≤ 60 o ≥ 61); spessore di Breslow (≤ 1.0 o ≥ 1.01 mm), ulcerazione (presente o assente) e sito anatomico della neoplasia primaria (ST-MM o NST-MM). Abbiamo analizzato i pazienti dalla data della prima visita alla data del decesso o ultimo follow up. I pazienti erano sottoposti a regolare follow up nel nostro Dipartimento con periodici esami e valutazione strumentale attraverso radiografie, ecografie, TC, RM, scintigrafia ossea e PET.

Analisi dei livelli sierici di vitamina D

Usando una randomizzazione elettronica, dal gruppo di pazienti ST-MM e NST-MM, abbiamo estrapolato pazienti che avevano asportato di recente un MM e abbiamo valutato i livelli di vitamina D. A tal proposito i livelli sierici di vitamina D erano stati dosati non più tardi di 30 giorni dalla diagnosi. Pazienti che assumevano supplementi di vitamina D (o supplementi di calcio) erano stati esclusi dall'analisi. Tutti i campioni erano dosati allo stesso laboratorio; livelli di vitamina D > 30 ng/ml erano considerati nel range di normalità, livelli sierici tra 20 e 29 ng/ml erano insufficienti e livelli < 19 ng/ml erano fortemente insufficienti. Tutte le analisi erano state eseguite nel periodo tra Maggio e Settembre alla latitudine di $41^{\circ}54'39''24$ Nord. Un consenso informato era stato firmato da ogni paziente prima dell'esecuzione dell'analisi e lo studio era stato approvato dal Comitato Etico del nostro Istituto. Per entrambi i pazienti ST-MM e NST-MM, i seguenti parametri erano stati valutati: sesso (maschio e femmina); età (≤ 60 o ≥ 61); sede anatomica della neoplasia primaria (assiale / periferica), spessore di

Breslow (≤ 1.00 mm; ≥ 1.01 mm) e ulcerazione (presente / assente). L'analisi era eseguita, non per valutare il significato prognostico dei valori della vitamina D, ma per effettuare un semplice studio osservazionale selezionato da questi due gruppi di pazienti affetti da melanoma. Successivamente abbiamo eseguito anche un'analisi dello stato di BRAF per ogni paziente affetto da MM, a seconda del sito anatomico della neoplasia primaria, e abbiamo confrontato questi risultati con i valori sierici della vitamina D.

Analisi statistica

La “disease free survival” (DFS) era calcolata dalla diagnosi della neoplasia primaria alla data della prima progressione, mentre l’“overall survival” (OS) era calcolata dalla diagnosi della neoplasia primaria alla data del decesso o ultimo follow up. Il prodotto di Kaplan-Meier era usato per stimare le curve di sopravvivenza per DFS e OS, e il Long-rank test era usato per valutare le differenze tra le curve di sopravvivenza. Pazienti che erano persi al follow up o che erano vivi al momento dell'ultimo follow up sono stati censurati alla data dell'ultimo follow up. Assumendo che gli effetti delle variabili predittive erano costanti nel tempo, i fattori predittivi indipendenti erano valutati dalla regressione proporzionale di Cox. Inoltre, per valutare le differenze riguardanti i livelli sierici di vitamina D in ST-MM e NST-MM è stata eseguita una Odds ratio. Successivamente, per valutare le corrispondenze tra mutazione di BRAF e livelli sierici di vitamina D, per quanto riguarda i siti anatomici, è stato effettuato il test McNemar. In tutti i metodi statistici, un valore di $p < 0.05$ era considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

Abbiamo analizzato un totale di 698 pazienti, tra questi 531 erano definiti come NST-MM, mentre 167 come ST-MM. Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte nella tabella 1 e 2.

Lo spessore di Breslow era ≥ 1.01 mm in 63 pazienti ST-MM (40%), con uno spessore mediano di 1.1 mm (range 0-7.5 mm); mentre era ≥ 1.01 in 170 pazienti NST-MM (32%) con uno spessore mediano di 0.6 mm (range 0-4.2 mm). Mentre per quanto riguarda l'ulcerazione, era presente in 21 pazienti ST-MM (14%) ed era presente in 54 NST-MM, cioè il 10%. Infine, l'età media era valutabile per i due gruppi, rispettivamente, 58 anni per i pazienti ST-MM e 54 anni per i pazienti NST-MM. Altre caratteristiche dei pazienti sono riportate nella tabella 1 e 2.

Melanoma NST-MM e ST-MM

Effettuando il prodotto Kaplan-Meier e il Long-rank test, la DFS era di 78 mesi nei pazienti NST-MM e 20.5 mesi nei pazienti ST-MM ($p < 0.0001$); anche a lungo termine un migliore comportamento era osservato per i NST-MM con una OS mediana di 80 mesi vs una OS mediana di 42 mesi per i pazienti ST-MM ($p < 0.0001$) (Fig. 1 a e 1 b). Specificamente, abbiamo trovato che una migliore DFS era osservata per i pazienti ST-MM con un'età mediana di ≤ 60 anni ($p < 0.003$), così come pazienti femmine ($p = 0.5$), spessore di Breslow ≤ 1.00 mm ($p < 0.004$) e MM senza ulcerazione ($p = 0.02$). Comunque, alla regressione dei rischi proporzionali di Cox (tra le variabili clinico-patologiche e DFS) solo l'età ($p < 0.001$) e spessore di Breslow ($p < 0.001$) arricchivano i dati statistici (Tab. 3).

Table 1 Baseline characteristics in non-shield-site melanoma (NST-MM) patients

	<i>N</i>	Median
<i>Gender</i>		
Male	261	NP
Female	270	
<i>Age</i>		
≥61	213	54
≤60	318	
<i>Ulceration</i>		
Presence	54	NP
Absence	477	
<i>Breslow</i>		
≤1.0 mm	361	0.6 mm
≥1.01 mm	170	

NP means not provided

Anche per quanto riguarda i pazienti NST-MM abbiamo trovato che una migliore DFS era osservata per i pazienti con un'età mediana di ≤ 60 anni ($p = 0.007$), così come pazienti femmine ($p = 0.2$); spessore di Breslow ≤ 1.00 mm ($p < 0.001$) e pazienti senza ulcerazione ($p < 0.0001$). Inoltre (come nei pazienti NST-MM), fattori come l'età ($p < 0.0001$) e il Breslow ($p < 0.001$) erano le sole variabili alla regressione dei rischi proporzionali di Cox (Fig. 2). Per quanto riguarda la OS nei pazienti NST-MM, i risultati mostravano un comportamento che rifletteva la DFS, con una migliore OS per pazienti ≤ 60 anni ($p < 0.0001$), spessore di Breslow ≤ 1.0 mm ($p = 0.04$) e MM senza ulcerazione ($p = 0.02$) (Tab. 3). Anche per i NST-MM un significato statistico era arricchito per variabili come età ≤ 60 anni (88 vs 70 mesi; $p = 0.02$), Breslow ≤ 1.00 mm (81 vs 70 mesi; $p < 0.019$) e assenza di ulcerazione (87 vs. 64 mesi; $p = 0.02$).

Table 2 Baseline characteristics in shield-sites melanoma (ST-MM) patients

	<i>N</i>	Median
<i>Gender</i>		
Male	60	NP
Female	107	
<i>Age</i>		
≥61	77	58
≤60	90	
<i>Ulceration</i>		
Presence	21	NP
Absence	146	
<i>Breslow</i>		
≤1.0 mm	104	1.1 mm
≥1.01 mm	63	

NP means not provided

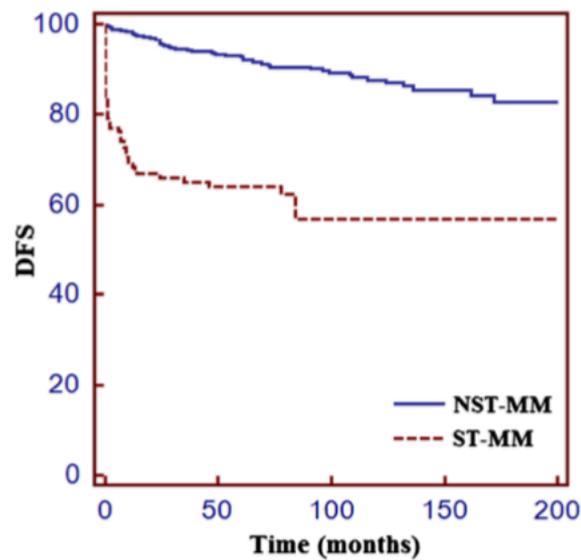


Fig. 1 Kaplan–Meier curves of disease-free survival (DFS) according to shield-site melanoma (ST-MM) and non-shield-site melanoma (NST-MM)

Table 3 Disease-free survival (DFS), overall survival (OS) and clinicopathological features in shield-site melanoma patients (ST-MM)

	DFS (median months)	<i>p</i> ^a	<i>p</i> ^b	OS (median months)	<i>p</i> ^c
<i>Gender</i>					
Male	63	NS	NS	63	NS
Female	65			68	
<i>Age</i>					
≥61	55	<0.003	<0.001	54	<0.0001
≤60	84			73	
<i>Ulceration</i>					
Presence	9	0.02	NS	15	0.02
Absence	42			82	
<i>Breslow</i>					
≥1.01 mm	18	<0.004	<0.001	43	0.04
≤1.00 mm	84			99	

p^a Kaplan–Meier product and log-rank test between DFS curves

p^b Cox proportional hazards regression between DFS and predictive factors analyzed

p^c Kaplan–Meier product and log-rank test between OS curves; *n* indicates number of patients. In italic, significant values

Analisi dei livelli sierologici di vitamina D

Nei pazienti che avevano asportato chirurgicamente da ≤ 30 giorni un MM, abbiamo dosato i livelli di vitamina D. A tal proposito, secondo una semplice randomizzazione 1:2.5, abbiamo diviso i pazienti rispettivamente in ST-MM e NST-MM, in modo da valutare uno studio osservazionale case control. Un totale di 25 pazienti ST-MM e 62 NST-MM sono stati selezionati. L'età mediana nei due gruppi era di 56 anni nei ST-MM e 57 anni nei pazienti NST-MM, lo spessore mediano di Breslow era di 0.7 mm nei ST-MM e 0.6 nei NST-MM, il rapporto M:F era 9M:16F in ST-MM vs 30M:32F in NST-MM e infine l'ulcerazione era presente nel 18% dei ST-MM e nel 9.6 % nei NST-MM. Abbiamo trovato che i livelli sierici mediani di vitamina D erano più alti nei NST-MM che nei ST-MM (24 vs. 20 ng/ml). Tra questi, nei pazienti ST-MM, cinque pazienti mostravano una deficienza di vitamina D, mentre tra quelli NST-MM solo due pazienti. Valutando l'Odds ratio, abbiamo trovato che i pazienti ST-MM mostravano bassi livelli di vitamina D confrontati con i pazienti NST-MM, sebbene senza incrementare i dati

statistici ($p = 0.09$). In conclusione, tra 87 pazienti con recente storia di melanoma (< 30 giorni), solo 11 pazienti (12.7%) mostravano valori normali sierici di vitamina D, indipendentemente dalla sede anatomica. I valori più bassi sono stati osservati nei pazienti ST-MM (Fig. 3).

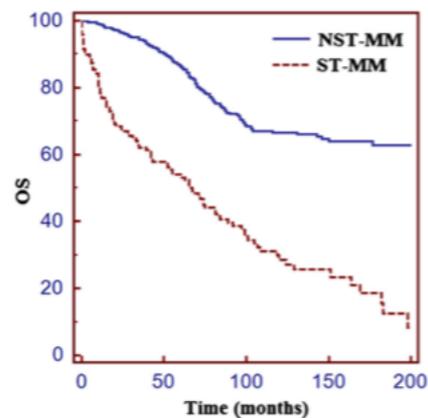


Fig. 2 Kaplan-Meier curves of overall survival (OS) according to shield-site melanoma (ST-MM) and non-shield-site melanoma (NST-MM)

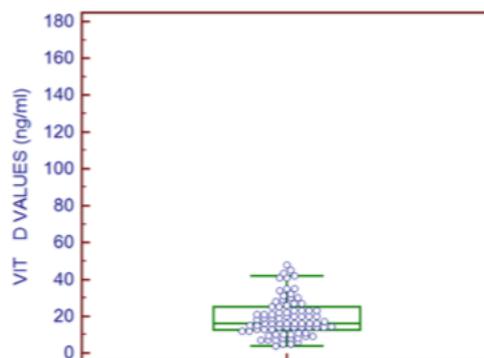


Fig. 3 Box-Plot. Median levels of vitamin D in shield-site melanoma (ST-MM) and non-shield-site melanoma (NST-MM)

Per quanto riguarda lo stato di BRAF, una mutazione dello stato di BRAF era presente nel 14% dei ST-MM e nel 41 % dei NST-MM. Valutando il test di McNemar, abbiamo notato una correlazione statisticamente significativa tra bassi livelli sierici di vitamina

D e bassa percentuale di mutazione di BRAF ($p = 0.03$) nei pazienti ST-MM, così come tra livelli sierici di vitamina D e più alta percentuale di mutazione di BRAF nei pazienti NST-MM ($p < 0.001$) (Tab. 4).

Table 4 BRAF mutation and serum levels of vitamin D (Vit. D) according to shield-sites (ST-MM) and non-shield-sites (NST-MM)

	BRAF	Vit. D	Significance
ST-MM	↓	↓	$p = 0.03$
NST-MM	↑	↑	$p < 0.001$

DISCUSSIONE

Il danno ossidativo gioca un ruolo chiave nello sviluppo del MM e l'esposizione ai raggi UV è uno dei più importanti fattori nello sviluppo del MM e dei NMSC.²¹⁵ Il MM del volto è fortemente associato all'esposizione solare cumulativa, mentre il MM del tronco e degli arti sembra correlato all'esposizione intermittente. Così l'esposizione solare cronica e intermittente e le scottature sono valori predittivi certi nello sviluppo di un MM su aree esposte e/o irregolarmente esposte, mentre poco è conosciuto sul suo coinvolgimento nelle aree non fotoesposte.^{216, 217} Nel nostro lavoro abbiamo trovato una migliore prognosi a breve (DFS) e a lungo termine (OS) nei pazienti NST-MM. Questo aspetto è confermato anche nella nostra analisi da una più alta percentuale di $MM \geq 1.01$ mm, osservati nei ST-MM (60%), confrontati con i NST-MM (47%). A tal proposito, certamente, la diagnosi precoce di un NST-MM gioca un ruolo centrale; infatti solo questa caratteristica da sola può contribuire alla differenza nella prognosi osservata nei due campioni (come anche riportato dalla presenza più alta di ulcerazione nei pazienti ST-MM, così come lo spessore mediano di Breslow) (Tab. 1 e 2). In questo contesto, un'eccezione potrebbe essere il MM della testa (con particolare riguardo al MM del cuoio capelluto). Questo sottotipo di MM spesso compare nei pazienti anziani, ed è conosciuto avere una peggiore prognosi, dovuto a: ostacoli nella diagnosi precoce, alla ricca e complessa rete vascolare presente nella testa e collo (che potrebbe facilitare la diffusione delle cellule del MM) e a una frequente escissione incompleta dei margini chirurgici.²¹⁸⁻²²¹ Infatti, nella nostra analisi abbiamo evidenziato che pazienti con MM del cuoio capelluto mostravano un'età mediana alta (62.5 anni; con un range tra 55 e 81 anni), con un alto valore mediano di Breslow di 2.5 mm (range tra 0.3 e 0.4 mm) e

una OS mediana di 50 mesi (range tra 28.3 e 172 mesi), confrontata con una OS mediana di 80 mesi nei restanti pazienti NST-MM. Riassumendo, secondo i dati della letteratura e i nostri risultati, possiamo concludere che le sedi anatomiche potrebbero determinare esse stesse una differente prognosi nei pazienti con MM cutaneo, indipendentemente da altre caratteristiche clinico-patologiche. Il melanoma del cuoio capelluto deve essere considerato separatamente, avendo un comportamento differente da tutti gli altri NST-MM. Mentre il danno causato dai raggi UVA e UVB sulle aree esposte al sole è una variabile indipendente allo sviluppo del MM, poco è conosciuto su il legame tra l'esposizione UV e rischio di MM nelle aree non fotoesposte. Così abbiamo deciso di valutare un'analisi dei valori sierologici della vitamina D nei pazienti con una recente diagnosi di MM (≤ 30 giorni).

La vitamina D è un secosteroide liposolubile, che agisce mantenendo l'omeostasi del calcio e del fosfato. La vitamina D deriva da due fonti - endogena (dalla sintesi nella cute - vitamina D₃) ed esogena (dieta o supplementi - vitamina D₂ e D₃).²²² Ha importanti funzioni biologiche, includendo la modulazione del sistema immune ed effetti antineoplastici. La vitamina D ha chiari effetti antiproliferativi su una proporzione di linee cellulari di MM "in vitro", e la variabilità di questi effetti è stata riportata essere correlata all'integrità del pathway di segnale della vitamina D.²²³ Infatti è stato trovato che bassi livelli sierici di vitamina D sono associati con incremento di neoplasie della mammella, del colon, della prostata così come del MM; inoltre, è stato anche dimostrato che animali mancanti del recettore della vitamina D (VDR), e con gravi deficienze di livelli di vitamina D, sono inclini allo sviluppo di una neoplasia.²²⁴ Nel nostro lavoro l'analisi sierologica è stata arbitrariamente valutata

durante un periodo con alta produzione di vitamina D dovuta ad aspetti ambientali (tra il mese di Maggio e Settembre) e alla latitudine (41°54'39"24 latitudine Nord). Infatti l'intensità delle radiazioni UV è cruciale nella produzione della vitamina D, da ciò è stata definita una variabilità stagionale, con incremento della produzione in estate e decremento in inverno. Considerando tutti questi aspetti, i livelli sierici mediani di vitamina D erano generalmente bassi nella nostra popolazione di pazienti affetti da MM, come riportato nella Box-plot (Fig. 3). Questa osservazione era più suggestiva per i pazienti ST-MM, che era il gruppo di pazienti che nell'analisi retrospettiva mostrava la peggiore prognosi. È molto probabile che le radiazioni UV attraverso la fotosintesi della vitamina D, hanno un effetto protettivo nei MM delle sedi esposte al sole, richiedendo dosi cumulative di raggi UV allo sviluppo di una neoplasia, spiegando anche come il MM del volto (come la lentigo maligna melanoma) di solito mostra una migliore prognosi.^{225,226} Per tale motivo, l'aumentata esposizione agli UVA e UVB con conseguente aumento della vitamina D potrebbe causare una redistribuzione della prognosi nei MM esposti al sole e in quelli non esposti. Il BRAF è una serin / treonin chinasi e un mediatore nel pathway RAS/RAF/MEK/ERK; questo pathway normalmente è associato a differenziazione cellulare, proliferazione e apoptosi.²²⁷ È noto che le mutazioni di BRAF non sono tipicamente associate a esposizione a raggi UV e che esse hanno un effetto indiretto sullo stato mutazionale di BRAF.^{227,228} In letteratura solo Qi et al.²³¹ hanno studiato un'associazione tra UV e mutazione di BRAF, comunque senza scoprire alcun effetto delle radiazioni UV sulla mutazione di BRAF. Recentemente, Massad et al.²²⁹ hanno dimostrato che le mutazioni di BRAF capitano più frequentemente nelle regioni con potenzialmente più

bassa esposizione solare, sia nei melanomi primari che metastatici; comunque, un'associazione tra esposizione solare e BRAF non è stata ancora confermata. Mentre Massad et al.²²⁹ hanno usato come metodo indiretto di esposizione alle UV, la latitudine, la longitudine e l'elastosi solare, noi abbiamo utilizzato come metodo indiretto per ST-MM, i livelli sierici di vitamina D. Nella nostra analisi, la mutazione di BRAF era presente in una percentuale comparabile con i dati riportati in letteratura²³², attraverso una classificazione secondo specifiche aree anatomiche, abbiamo mostrato una percentuale più bassa di mutazione di BRAF nei ST-MM. Comunque per nostra conoscenza fino ad adesso nel MM non sono state studiate le correlazioni tra livelli sierici di vitamina D e mutazione di BRAF. Recentemente, Zou et al.²³⁰ nel caso papillifero della tiroide hanno riportato che il legame tra vitamina D e il pathway di segnale delle MAP chinasi risulta nella resistenza agli effetti antitumorali mediati dal calcitriolo e che un'alta percentuale di mutazione di BRAF è presente in associazione con alti livelli di CYP24A1, che sua volta declina gli effetti della vitamina D.^{230, 231} Secondo la nostra analisi nel MM abbiamo osservato che il gruppo di pazienti con bassi livelli di vitamina D (ST-MM) erano statisticamente correlati con anche bassi livelli di mutazione di BRAF, mentre il contrario era osservato per quelli NST-MM (Tab. 4). Infatti, la mutazione di BRAF è generalmente bassa nei MM che originano nelle aree con esposizione cronica al sole, dove la mutazione di KIT è presente in circa il 20 % dei casi (esclusiva mutazione di BRAF): a tal proposito, molto probabilmente il pathway di KIT gioca un ruolo cardine nel MM delle aree esposte cronicamente al sole. Comunque, un comportamento simile è presente anche nei MM di siti anatomici particolari (siti con cute glabra e acrale), per i quali è riportata un'alta percentuale di

positività di KIT.²³⁵ Molto probabilmente nei ST-MM della cute glabra, l'assenza di cellule staminali nella regione del bulge del follicolo pilifero potrebbe spiegare la patogenesi della neoplasia in questa regione anatomica, che mostra un più aggressivo comportamento, come anche riportato nella nostra analisi retrospettiva. Per questo motivo, altri fattori così come differenze biologiche tra melanociti di queste regioni anatomiche possono giocare un ruolo cruciale nella patogenesi del melanoma.²³⁶ Una limitazione di questo studio era che il gruppo di MM valutato secondo i valori sierici di vitamina D e presenza / assenza di mutazione di BRAF non era molto ampio. Inoltre un'altra limitazione era che il follow up di questa classe di pazienti è troppo breve per valutare l'analisi della sopravvivenza a lungo termine secondo la relazione tra livelli di vitamina D e mutazione di BRAF, sia per ST-MM che NST-MM. Per tale motivo, le nostre osservazioni potrebbero essere nuovo motivo di studio in futuro. In conclusione, secondo un'ampia analisi retrospettiva, ST-MM mostrano una peggiore prognosi rispetto a NST-MM. Abbiamo anche osservato come, al momento della diagnosi, di solito ST-MM presentano livelli più bassi di vitamina D; per tale motivo, questo aspetto potrebbe spiegare la peggiore prognosi nello studio retrospettivo per i pazienti ST-MM (in assenza di attività antiproliferativa della vitamina D). Infine, abbiamo osservato che la bassa percentuale di mutazione di BRAF era direttamente correlata con bassi livelli di vitamina D nei ST-MM, così come al contrario abbiamo osservato per i pazienti NST-MM. Tutte queste scoperte confermano l'ipotesi che nei ST-MM altri pathways (non ancora scoperti) giocano ruoli fondamentali per l'inizio della patologia e per il relativo aggressivo comportamento, se confrontato con il MM originato sulle zone a esposizione cronica o intermittente.

BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2010; <http://globocan.iarc.fr>.
2. Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* 2009 Jan-Feb; 27(1):3-9.
3. Verdecchia A, Guzzinati S, Francisci S, De Angelis R, Bray F, Allemani C, Tavilla A, Santaquilani M, Sant M; EUROCORE Working Group. Survival trends in European cancer patients diagnosed from 1988 to 1999. *Eur J Cancer* 2009 Apr; 45(6):1042-66.
4. AIOM, AIRTUM. I numeri del cancro in Italia 2011. Intermedia editore, 2011.
5. AIRTUM Working Group. I Tumori in Italia-Rapporto 2009. I trend dei tumori negli anni duemila (1998-2005). *Epidemiologia & Prevenzione* Anno 33 (4-5) luglio-ottobre 2009 (supplemento n. 1); <http://www.registri-tumori.it>.
6. AIRTUM Working Group. I Tumori in Italia-Rapporto 2010. La prevalenza dei tumori in Italia. *Epidemiologia & Prevenzione* Anno 34 (5-6) settembre-dicembre 2010 (supplemento n. 2); <http://www.registri-tumori.it>.
7. AIRTUM Working Group. I Tumori in Italia-Rapporto 2011. La sopravvivenza dei pazienti oncologici in Italia. *Epidemiologia & Prevenzione* Anno 35 (5-6) settembre-dicembre 2011 (supplemento n. 3).

8. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD et al. Sunlight exposure, pigmentation factors, and risk of nonmelanocytic skin cancer. II. Squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol* 1995; 131: 164–169.
9. Chen J, Ruczinski I, Jorgensen TJ et al. Nonmelanoma skin cancer and risk for subsequent malignancy. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 1215–1222.
10. Marcil I, Stern RS. Risk of developing a subsequent nonmelanoma skin cancer in patients with a history of nonmelanoma skin cancer: a critical review of the literature and meta-analysis. *Arch Dermatol* 2000; 136: 1524–1530.
11. Graells J. The risk and risk factors of a second non-melanoma skin cancer: a study in a Mediterranean population. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004; 18: 142–147.
12. Karagas MR, Stukel TA, Greenberg ER, Baron JA, Mott LA, Stern RS. Risk of subsequent basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin among patients with prior skin cancer. Skin Cancer Prevention Study Group. *JAMA* 1992; 267: 3305–3310.
13. Mi Ryung ROH,¹ Hyun Joon SHIN,² Soo Hyun LEE,¹ Kee Yang CHUNG¹ Risk of second cancers after the diagnosis of non-melanoma skin cancer in Korean patients *Journal of Dermatology* 2012; 39: 541–544.
14. Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005;353:2262–2269.
15. Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2001;344:975–983.
16. Armstrong BK, Krickler A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 2001;63:8–18.

17. Serewko MM, Popa C, Dahler AL, et al. Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development. *Cancer Res* 2002;62:3759–3765.
18. Lind MH, Rozell B, Wallin RP, et al. Tumor necrosis factor receptor 1-mediated signaling is required for skin cancer development induced by NF-kappaB inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:4972–4977.
19. Heller ER, Gor A, Wang D, et al. Molecular signatures of basal cell carcinoma susceptibility and pathogenesis: A genomic approach. *Int J Oncol* 2013;42:583–596.
20. Nindl I, Dang C, Forschner T, et al. Identification of differentially expressed genes in cutaneous squamous cell carcinoma by microarray expression profiling. *Mol Cancer* 2006;5:30.
21. Haider AS, Peters SB, Kaporis H, et al. Genomic analysis defines a cancer-specific gene expression signature for human squamous cell carcinoma and distinguishes malignant hyperproliferation from benign hyperplasia. *J Invest Dermatol* 2006;126:869–881.
22. Asplund A, Gry Bjorklund M, Sundquist C, et al. Expression profiling of microdissected cell populations selected from basal cells in normal epidermis and basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2008;158:527–538.
23. Backvall H, Asplund A, Gustafsson A, Sivertsson A, Lundeberg J, Ponten F. Genetic tumor archeology: Microdissection and genetic heterogeneity in squamous and basal cell carcinoma. *Mutat Res* 2005;571:65–79.

24. Quintana RM, Dupuy AJ, Bravo A, et al. A transposon-based analysis of gene mutations related to skin cancer development. *J Invest Dermatol* 2013;133:239–248.
25. Ulrich C, Kanitakis J, Stockfleth E, Euvrard S. Skin cancer in organ transplant recipients—Where do we stand today? *Am J Transplant* 2008;8:2192–2198.
26. Crowson AN. Basal cell carcinoma: Biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol* 2006;19:S127–S147.
27. NCCN clinical practice guidelines: Basal and Squamous Cell. 2013.
28. Yanofsky VR, Mercer SE, Phelps RG. Histopathological variants of cutaneous squamous cell carcinoma: A review. *J Skin Cancer* 2011;2011:210813.
29. Menzies SW. Is sun exposure a major cause of melanoma? Yes. *BMJ* 2008; 337:a763.
30. Shuster S. Is sun exposure a major cause of melanoma? No. *BMJ* 2008; 337:a764.
31. Elwood JM, Hislop TG. Solar radiation in the etiology of cutaneous malignant melanoma in Caucasians. *Natl Cancer Inst Monogr* 1982; 62:167-71.
32. Armstrong BK. Epidemiology of malignant melanoma: intermittent or total accumulated exposure to the sun? *J Dermatol Surg Oncol* 1988 Aug; 14 (8):835-49.
33. National Institutes of Health summary of the Consensus Development Conference on Sunlight, Ultraviolet Radiation, and the Skin. Bethesda, Maryland, May 8-10, 1989. Consensus Development Panel. *J Am Acad Dermatol* 1991 Apr; 24(4):608-12.
34. International Agency for Research on Cancer (IARC). Solar and ultraviolet radiation. Monographs on the evaluation carcinogenic risk to humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon 1992: vol. 55.

35. Noonan FP, Recio JA, Takayama H et al: Neonatal sunburn and melanoma in mice. *Nature* 2001; 413:271-2.
36. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 2005 Jan; 41(1):28-44.
37. Dennis LK, Vanbeek MJ, Beane Freeman LE, Smith BJ, Dawson DV, Coughlin JA. Sunburns and risk of cutaneous melanoma: does age matter? A comprehensive meta-analysis. *Ann Epidemiol* 2008 Aug; 18(8):614-27.
38. Chang YM, Barrett JH, Bishop DT, Armstrong BK, Bataille V, Bergman W, Berwick M, et al. Newton-Bishop JA. Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. *Int J Epidemiol* 2009 Jun; 38(3):814-30.
39. Grulich AE, Bataille V, Swerdlow AJ, Newton-Bishop JA, Cuzick J, Hersey P, McCarthy WH. Naevi and pigmentary characteristics as risk factors for melanoma in a high-risk population: a case-control study in New South Wales, Australia. *Int J Cancer* 1996 Aug 7; 67(4):485-91.
40. Bataille V, Grulich A, Sasieni P, Swerdlow A, Newton Bishop J, McCarthy W, Hersey P, Cuzick J. The association between naevi and melanoma in populations with different levels of sun exposure: a joint case-control study of melanoma in the UK and Australia. *Br J Cancer* 1998; 77(3):505-10.
41. MacKie RM, McHenry P, Hole D. Accelerated detection with prospective surveillance for cutaneous malignant melanoma in high-risk groups. *Lancet* 1993 Jun 26; 341(8861):1618-2.

42. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 2005 Jan; 41(1):45-60.
43. Peto J, Houlston RS. Genetics and the common cancers. *Eur J Cancer* 2001 Oct; 37 Suppl 8:S88-96.
44. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, chronic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* 2005 Sep; 41(14):2040-59.
45. Olsen CM, Carroll HJ, Whiteman DC. Estimating the attributable fraction for melanoma: a meta-analysis of pigmentary characteristics and freckling. *Int J Cancer* 2010 Nov 15; 127(10):2430-45.
46. Freedberg KA, Geller AC, Miller DR, Lew RA, Koh HK. Screening for malignant melanoma: A cost-effectiveness analysis. *J Am Acad Dermatol* 1999 Nov; 41(5 Pt 1):738-45.
47. MacKie RM, McHenry P, Hole D. Accelerated detection with prospective surveillance for cutaneous malignant melanoma in high-risk groups. *Lancet* 1993 Jun 26; 341(8861):1618-20.
48. Gallagher RP, Spinelli JJ, Lee TK. Tanning beds, sunlamps, and risk of cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005 Mar; 14 (3):562-6.
49. International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet (UV) light and skin cancer. The association of use of sunbeds with cutaneous

malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer* 2007 Mar 1; 120(5):1116-22.

50. Lazovich D, Vogel RI, Berwick M, Weinstock MA, Anderson KE, Warshaw EM. Indoor tanning and risk of melanoma: a case-control study in a highly exposed population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010 Jun; 19(6):1557-68.
51. El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Cogliano V; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens-part D: radiation. *Lancet Oncol* 2009 Aug; 10(8):751-2.
52. Autier P, Doré JF, Négrier S, Liénard D, Panizzon R, Lejeune FJ, Guggisberg D, Eggermont AM. Sunscreen use and duration of sun exposure: a double-blind, randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 1999 Aug 4; 91(15):1304-9.
53. Autier P, Doré JF, Reis AC, Grivegnée A, Ollivaud L, Truchetet F, Chamoun E, Rotmensz N, Severi G, Césarini JP. Sunscreen use and intentional exposure to ultraviolet A and B radiation: a double blind randomized trial using personal dosimeters. *Br J Cancer* 2000 Nov; 83(9):1243-8.
54. Huncharek M, Kupelnick B. Use of topical sunscreens and the risk of malignant melanoma: a meta-analysis of 9067 patients from 11 case-control studies. *Am J Public Health* 2002 Jul; 92(7):1173-7.
55. Dennis LK, Beane Freeman LE, VanBeek MJ. Sunscreen use and the risk for melanoma: a quantitative review. *Ann Intern Med* 2003 Dec 16; 139(12):966-78.
56. Autier P. Sunscreen abuse for intentional sun exposure. *Br J Dermatol* 2009 Nov; 161 Suppl 3:40-5.

57. Pfahlberg A, Hassan K, Wille L, Lausen B, Gefeller O. Systematic review of case-control studies: oral contraceptives show no effect on melanoma risk. *Public Health Rev* 1997; 25(3-4):309-15.
58. Karagas MR, Stukel TA, Dykes J, Miglionico J, Greene MA, Carey M, Armstrong B, Elwood JM, Gallagher RP, Green A, Holly EA, Kirkpatrick CS, Mack T, Rosso S, Swerdlow AJ. A pooled analysis of 10 case-control studies of melanoma and oral contraceptive use. *Br J Cancer* 2002 Apr 8; 86(7):1085-92.
59. Lens M, Bataille V. Melanoma in relation to reproductive and hormonal factors in women: current review on controversial issues. *Cancer Causes Control* 2008 Jun; 19(5):437-42.
60. Gandini S, Iodice S, Koomen E, Pietro AD, Sera F, Caini S. Hormonal and reproductive factors in relation to melanoma in women: Current review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2011 Nov; 47(17):2607-17. Epub 2011 May 26.
61. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 2005 Jan; 41(1):45-60.
62. Pack GT, Scharnagel IM, Hillyer RA. Multiple primary melanoma. *Cancer* 1952 nov; 5(6):1110-5.
63. Ferrone CR, Ben Porat L, Panageas KS, Berwick M, Halpern AC, Patel A, Coit DG. Clinicopathological features of and risk factors for multiple primary melanomas. *JAMA*. 2005 Oct 5; 294(13):1647-54.

64. Manganoni AM, Farisoglio C, Tucci G, Facchetti F, Calzavara Pinton PG. The importance of self-examination in the earliest diagnosis of multiple primary cutaneous melanomas: a report of 47 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007 Nov; 21(10):1333-6.
65. De Giorgi V, Rossari S, Papi F, Gori A, Alfaioli B, Grazzini M, Crocetti E, Verdelli A, Foo CW, Lotti T. Multiple primary melanoma: the impact of atypical naevi and follow up. *Br J Dermatol* 2010 Dec; 163(6):1319-22 .
66. Blackwood MA, Holmes R, Synnestvedt M, Young M, George C, Yang H, Elder DE, Schuchter LM, Guerry D, Ganguly A. Multiple primary melanoma revisited. *Cancer* 2002 Apr 15; 94(8):2248-55.
67. Puig S, Malvehy J, Badenas C, Ruiz A, Jimenez D, Cuellar F, Azon A, González U, Castel T, Campoy A, Herrero J, Martí R, Brunet-Vidal J, Milà M. Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *J Clin Oncol* 2005 May 1; 23(13):3043-51.
68. Fortes C, de Vries E. Nonsolar occupational risk factors for cutaneous melanoma. *Int J Dermatol* 2008; 47(4):319-28.
69. Gallagher RP, Rivers JK, Lee TK, Bajdik CD, McLean DI, Coldman AJ. Broad-spectrum sunscreen use and the development of new nevi in white children: A randomized controlled trial. *JAMA* 2000 Jun 14; 283(22):2955-60.
70. English DR, Milne E, Jacoby P, Giles-Corti B, Cross D, Johnston R. The effect of a school-based sun protection intervention on the development of melanocytic nevi in children: 6-year follow-up. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005 Apr; 14(4):977-80.

71. Naldi L, Chatenoud L, Bertuccio P, Zinetti C, Di Landro A, Scotti L, La Vecchia C; Oncology Cooperative Group of the Italian Group for Epidemiologic Research in Dermatology (GISED). Improving sun- protection behavior among children: results of a cluster-randomized trial in Italian elementary schools. The "SoleSi SoleNo-GISED" Project. *J Invest Dermatol* 2007 Aug; 127(8):1871-7.
72. Weinstock MA, Rossi JS, Redding CA, Maddock JE. Randomized controlled community trial of the efficacy of a multicomponent stage- matched intervention to increase sun protection among beachgoers. *Prev Med* 2002 Dec; 35(6):584-92.
73. Dietrich AJ, Olson AL, Sox CH, Tosteson TD, Grant-Petersson J. Persistent increase in children's sun protection in a randomized controlled community trial. *Prev Med* 2000 Nov; 31(5):569-74.
74. Lowe JB, Ball J, Lynch BM, Baldwin L, Janda M, Stanton WR, Aitken JF. Acceptability and feasibility of a community-based screening programme for melanoma in Australia. *Health Promot Int* 2004 Dec; 19(4):437-44.
75. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005; 353(20):2135-47.
76. Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. *N Engl J Med* 2006; 355(1):51-65.
77. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *The Lancet* 2005, 365:687-701.
78. Palmieri G, Capone ME, Ascierto ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, Sini MC, Palla M, Mozzillo N, Ascierto PA. Main roads to melanoma. *J Transl Med* 2009; 7:86.

79. Casula M, Muggiano A, Cossu A, Budroni M, Caracò C, Ascierto PA, Pagani E, Stanganelli I, Canzanella S, Sini MC, Palomba G, The Italian Melanoma Intergroup (IMI), Palmieri G. Role of key-regulator genes in melanoma susceptibility and pathogenesis among patients from South Italy. *BMC Cancer* 2009; 9:352.
80. Hansson J. Familial cutaneous melanoma. *Adv Exp Med Biol* 2010; 685:134-45.
81. Box NF, Terzian T. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008; 21:525-33.
82. Giehl K. Oncogenic Ras in tumor progression and metastasis. *Biol Chem* 2005; 386:193-205.
83. Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2006; 126(1):154-60.
84. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5:875-85.
85. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417(6892):949-54.
86. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M P et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003; 33(1):19-20.
87. Fargnoli MC, Pike K, Pfeiffer RM, et al. MC1R variants increase risk of melanomas harboring BRAF mutations. *J Invest Dermatol* 2008; 128:2485-90.
88. Dumaz N, Hayward R, Martin J, Ogilvie L, Hedley D et al. In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res* 2006; 66:9483-91.

89. Montagut C, Sharma SV, Shioda T, McDermott U, Ulman M et al. Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res* 2008; 68(12):4853-61.
90. Pho LN, Leachman SA. Genetics of pigmentation and melanoma predisposition. *G Ital Dermatol Venereol* 2010 Feb; 145(1):37-45.
91. Wellbrock C, Rana S, Paterson H. Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PloS ONE* 2008; 3:2734.
92. Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet* 2004; 38:365-411.
93. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 2005; 436:117-22.
94. Smalley KSM, Vernon K, Weber S, Weber J. c-Kit signaling as the driving oncogenic event in sub-groups of melanomas. *Histology and histopathology cellular and molecular biology. J Pathol* 2009; 29:643-50.
95. Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res* 2008; 14(21):6821-8.
96. Zabierowski SE, Herlyn M. Melanoma stem cells: the dark seed of melanoma. *J Clin Oncol* 2008; 26:2890-94.
97. Fukunaga-Kalabis M, Roesch A, Herlyn M. From cancer stem cells to tumor maintenance in melanoma. *J Invest Dermatol* 2011; 131:1600-4.

98. Taghizadeh R, Noh M, Huh YH, Ciusani E, Sigalotti L et al. ACXCR6, a newly defined biomarker of tissue-specific stem cell asymmetric selfrenewal, identifies more aggressive human melanoma cancer stem cells. *PLoS One* 2010 Dec 22; 5(12):e15183.
99. Ler AC, Swetter SM, Brooks K, Demierre MF, Yaroch AL. Screening, early detection, and trends for melanoma: current status (2000-2006) and future directions. *J Am Acad Dermatol* 2007 Oct; 57(4):555-72.
100. Bafounta ML, Beauchet A, Aegerter P, Saiag P. Is dermoscopy (epiluminescence microscopy) useful for the diagnosis of melanoma? Results of a meta-analysis using techniques adapted to the evaluation of diagnostic test. *Arch Dermatol* 2001; 137:1343-50.
101. Kittler K, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncol* 2002; 3:159-65.
102. Carli P, De Giorgi V, Palli D, Maurichi A, Mulas P, Orlandi C, Imberti G, Stanganelli I, Soma P, Dioguardi D, Catricalá C, Betti R, Paoli S, Bottoni U, Lo Scocco G, Scalvenzi M, Giannotti B. Patterns of detection of superficial spreading and nodular-type melanoma: a multicenter Italian study. *Dermatol Surg* 2004 Nov; 30(11):1371-5; discussion 1375-6.
103. Gachon J, Beaulieu P, Sei JF, Gouvernet J, Claudel JP, Lemaitre M, Richard MA et al. First prospective study of the recognition process of melanoma in dermatological practice. *Arch Dermatol* 2005; 141:434-8.

104. Scope A, Dusza SW, Halpern AC, Rabinovitz H, Braun RP, Zalaudek I, Argenziano G, Marghoob AA. The "ugly duckling" sign: agreement between observers. *Arch Dermatol* 2008 Jan; 144(1):58-64.
105. Consiglio Nazionale delle Ricerche. Basi scientifiche per la definizione di linee guida in ambito clinico per il Melanoma Cutaneo. CNR - Roma, 2000.
106. Geller AC, Swetter SM, Brooks K, Demierre MF, Yaroch AL. Screening, early detection, and trends for melanoma: current status (2000-2006) and future directions. *J Am Acad Dermatol* 2007 Oct; 57(4):555-72.
107. Pizzichetta MA, Stanganelli I, Bono R, Soyer HP, Magi S, et al. Italian Melanoma Intergroup (IMI). Dermoscopic features of difficult melanoma. *Dermatol Surg* 2007 Jan; 33(1):91-9.
108. Peris K, Ferrari A, Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S. Dermoscopic classification of Spitz/Reed nevi. *Clin Dermatol* 2002 May-Jun; 20(3):259-62.
109. Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S et al. Dermoscopy of pigmented skin lesions: results of a consensus meeting via the Internet. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48: 679-93.
110. Gualandri L, Betti R, Crosti C. Clinical features of 36 cases of amelanotic melanomas and considerations about the relationship between histologic subtypes and diagnostic delay. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009 Mar; 23(3):283-7.
111. Carli P, De Giorgi V, Chiarugi A, Nardini P, Weinstock MA, Crocetti E, Stante M, Giannotti B. Addition of dermoscopy to conventional nakedeye examination in melanoma screening: a randomized study. *J Am Acad Dermatol* 2004; 50:683-9.

112. Nachbar F, Stolz W, Merkle T et al. The ABCD rule of dermatoscopy. High prospective value in the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 551-9.
113. Menzies SW, Ingvar C, Crotty KA, McCarthy WH. Frequency and morphologic characteristics of invasive melanomas lacking specific surface microscopic features. *Arch Dermatol* 1996; 132: 1178-82.
114. Argenziano G, Fabbrocini G, Carli P, De Giorgi V, Sammarco E, Delfino M. Epiluminescence microscopy for the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. Comparison of the ABCD rule of dermatoscopy and a new 7-point checklist based on pattern analysis. *Arch Dermatol* 1998; 134: 1563-70.
115. Scope A, Benvenuto-Andrade C, Agero AL et al. In vivo reflectance confocal microscopy imaging of melanocytic skin lesions: consensus terminology glossary and illustrative images, *J Am Acad Dermatol* 2007 Oct;57(4):644-58. Epub 2007 Jul 16.
116. Guitera P, Pellacani G, Longo C, Seidenari S, Avramidis M, Menzies SW. In vivo reflectance confocal microscopy enhances secondary evaluation of melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 2009 Jan; 129 (1):131-8.
117. Clark WH Jr, Elder DE, DuPont G IV, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D et al. Model predicting survival in stage I melanomabased on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81:1893-1904.
118. Elder DE, Murphy GF (1991) *Atlas of Tumor Pathology: Melanocytic tumors of the skin*. Third series. Rosai J, (Ed). Washington D.C. Armed Forces Institute of Pathology: pp103-205.

119. Elder DE, Guerry D IV, Epstein MN, Zehngbot L, Lusk E, VanHorn M et al. Invasive malignant neoplasms lacking competence for metastasis. *Am J Dermatopathol* 1984; 6 (Suppl 1):55-61.
120. Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969; 29:705-27.
121. McGovern VJ. The classification of melanoma and its relationship with prognosis. *Pathology* 1970; 2:85-98.
122. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasain A. (Eds.). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology & Genetics of Skin tumours. IARC Press, Lyon, 2006.
123. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009; 27:6199-206.
124. Gershenwald JE, Soong SJ, Balch CM. 2010 TNM staging system for cutaneous melanoma and beyond. *Ann Surg Oncol* 2010; 17:1475-77.
125. Soong SJ, Ding S, Coit D, Balch CM, Gershenwald JE, Thompson JF, Gimotty P. Predicting survival outcome of localized melanoma: an electronic prediction tool based on the AJCC melanoma database. *Ann Surg Oncol* 2010; 17:2006-14.
126. Scolyer RA, Murali R, Satzger I, Thompson JF. The detection and significance of melanoma micrometastases in sentinel nodes. *Surg Oncol* 2008; 17:165-74.

127. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005; 365:687-701.
128. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Brocker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005; 353:2135-47.
129. Bauer J, Buttner P, Murali R, Okamoto I, Kolaitis NA, Landi MT, Scolyer RA, Bastian BC. 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.
130. Arkenau HT, Kefford R, Long GV. Targeting BRAF for patients with melanoma. *Br J Cancer* 2010; 104:392-8.
131. Flaherty KT, Hodi FS, Bastian BC. Mutation-driven drug development in melanoma. *Curr Opin Oncol* 2010; 22:178-183.
132. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363:809-19.
133. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, Hughes TM, Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2011; 29:1239-46.
134. Broekaert SM, Roy R, Okamoto I, van den Oord J, Bauer J, Garbe C, Barnhill RL, Busam KJ, Cochran AJ, Cook MG, Elder DE, McCarthy SW, Mihm MC,

- Schadendorf D, Scolyer RA, Spatz A, Bastian BC. Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23:763-70.
135. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* 2006; 24:4340-46.
136. Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, Bastian BC. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med* 2008; 5:941-52.
137. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970; 172 902-8.
138. Clark WH Jr, Elder DE, DuPont G IV, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D et al. Model predicting survival in stage I melanomabased on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81:1893-1904.
139. Elder DE, Murphy GF (1991) *Atlas of Tumor Pathology: Melanocytic tumors of the skin. Third series.* Rosai J, (Ed). Washington D.C. Armed Forces Institute of Pathology: pp 103-205.
140. Elder DE, Guerry D IV, Epstein MN, Zehngebot L, Lusk E, VanHorn M et al. Invasive malignant neoplasms lacking competence for metastasis. *Am J Dermatopathol* 1984; 6 (Suppl 1):55-61.
141. Murali R, Shaw HM, Lai K, McCarthy SW, Quinn MJ, Stretch JR, Thompson JF, Scolyer RA. Prognostic factors in cutaneous desmoplastic melanoma: a study of 252 patients. *Cancer* 2010; 116:4130-38.

142. Scolyer RA, Prieto VG. Melanoma pathology: important issues for clinicians involved in the multidisciplinary care of melanoma patients. *Surg Oncol Clin N Am* 2011; 20:19-37.
143. Chen JY, Hruby G, Scolyer RA, Murali R, Hong A, Fitzgerald P, Pham TT, Quinn MJ, Thompson JF. Desmoplastic neurotropic melanoma: a clinicopathologic analysis of 128 cases. *Cancer* 2008; 113:2770-8.
144. Scolyer RA, Thompson JF, Stretch JR, Sharma R, McCarthy SW. Pathology of melanocytic lesions: new, controversial, and clinically important issues. *J Surg Oncol* 2004; 86:200-11.
145. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma in the era of molecular profiling. *Lancet* 2009; 374:362-5.
146. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin, H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417:949-54.
147. Garrido MC, Bastian BC. KIT as a therapeutic target in melanoma. *J Invest Dermatol* 2010; 130:20-7.

148. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, Simpson EM, Barsh GS, Bastian BC. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* 2009; 457:599-602.
149. Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Vemula S, Wiesner T, Obenaus AC, Wackernagel W, Green G, Bouvier N, Sozen MM, Baimukanova G, Roy R, Heguy A, Dolgalev I, Khanin R, Busam K, Speicher MR, O'Brien J, Bastian BC. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363:2191-99.
150. Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced cell senescence e halting on the road to cancer. *N Engl J Med* 2006; 355:1037-46.
151. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 20;27(36):6199-206.
152. AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition 2010, published by Springer Science and Business Media LLC (SBM) www.springer.com.
153. Richetta AG, Bottoni U, Paolino G, Clerico R, Cantisani C, Ambrifi M, Corsetti P, Calvieri S Thin melanoma and late recurrences: it is never too thin and never too late. *Med Oncol.* 2014 Apr;31(4):909.
154. Gutman S, Kessler LG. The US Food and Drug Administration perspective on cancer biomarker development. *Nat Rev Cancer* 2006 Jul; 6(7):565-71.
155. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Elashoff R, Essner R, Nieweg OE, Roses DF, Hoekstra HJ, Karakousis CP, Reintgen DS, Coventry BJ,

- Glass EC, Wang HJ; MSLT Group. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med* 2006 Sep 28; 355(13):1307-17.
156. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*. 1992 Apr; 127(4):392-9.
157. Van Akkooi AC, De Wilt JH, Verhoef C, Graveland WJ, Van Geel AN et al. High positive sentinel node identification rate by EORTC melanoma group protocol. Prognostic indicators of metastatic patterns after sentinel node biopsy in melanoma. *Eur J Cancer* 2006 Feb; 42(3):372-80.
158. Burton AL, Roach BA, Mays MP, Chen AF, Ginter BA et al. Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in melanoma. *Am Surg* 2011 Feb; 77(2):188-92.
159. Peal RA, Pacifico MD, Richman PI, Wilson GD, Grover R. Stratification of patients by melanoma cell adhesion molecule (MCAM) expression on the basis of risk: implications for sentinel lymph node biopsy. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2008; 61(3):265-71.
160. Rangel J, Nosrati M, Torabian S, Shaikh L, Leong SP et al. Osteopontin as a molecular prognostic marker for melanoma. *Cancer* 2008 Jan 1;112(1):144-50.
161. Väisänen AH, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T. Comparison of the prognostic value of matrix metalloproteinases 2 and 9 in cutaneous melanoma. *Hum Pathol* 2008 Mar; 39(3):377-85.

162. Alonso SR, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gómez B, Sánchez L et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol* 2004 Jan; 164(1):193-203.
163. Sharpless NE, Kannan K, Xu J, Bosenberg MW, Chin L. Both products of the mouse Ink4a/Arf locus suppress melanoma formation in vivo. *Oncogene* 2003 Aug 7; 22(32):5055-9.
164. Deichmann M, Benner A, Bock M, Jäckel A, Uhl K, Waldmann V, Näher H. S100-Beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer stage IV melanoma. *J Clin Oncol* 1999 Jun;17(6):1891-6.
165. Gaynor R, Irie R, Morton D, Herschman HR. S100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature* 1980 Jul 24; 286(5771):400-1.
166. Guo HB, Stoffel-Wagner B, Bierwirth T, Mezger J, Klingmüller D. Clinical significance of serum S100 in metastatic malignant melanoma. *Eur J Cancer* 1995 Oct; 31A(11):1898-902.
167. Bottoni U, Izzo P, Richetta A, Mannooranparampil TJ, Del Giudice M, Reale MG, Frati L, Calvieri S. S100 serum level: a tumour marker for metastatic melanoma. *Melanoma Res.* 2003 Aug;13(4):427-9.
168. Xing Y, Bronstein Y, Ross MI, Askew RL, Lee JE, Gershenwald JE, Royal R, Cormier JN. Contemporary diagnostic imaging modalities for the staging and surveillance of melanoma patients: a meta-analysis. *JNCI* 2011;103 (2):129-42.

169. Testori A, Rutkowski P, Marsden J, Bastholt L, Chiaron-Sileni V, Hauschild A, Eggermont AMM. Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. *Ann Oncol* 2009; 20s6:vi22-9.
170. Blazer DG, Sondak VK, Sabel MS. Surgical therapy of cutaneous melanoma. *Sem Oncol* 2007; 34:270-80.
171. Marsden JR, Newton-Bishop JA, Burrows L, Cook M, Corrie PG et al. Revised UK guidelines for the management of cutaneous melanoma 2010. *J Plast Reconstr Aesth Surg* 2010; 63:1401-19.
172. Mocellin S, Pasquali S, Nitti D. The impact of surgery on survival of patients with cutaneous melanoma: revisiting the role of primary tumor excision margins. *Ann Surg* 2011; 353:238-43.
173. Gershenwald JE, Ross MI. Sentinel-lymph-node biopsy for cutaneous melanoma. Gershenwald JE, Ross MI. *N Engl J Med*. 2011 May 5;364(18):1738-45.
174. Pawlik TM, Ross MI, Johnson MM et al. Predictors and natural history of in-transit melanoma after sentinel lymphadenectomy. *Ann Surg Oncol* 2005; 12(8):587-96.
175. Zogakis TG, Bartlett DL, Libutti SK et al. Factors affecting survival after complete response to isolated limb perfusion in patients with intransit melanoma. *Ann Surg Oncol* 2001; 8(10):771-8.
176. Creech O Jr, Ryan RF, Krementz ET. Regional chemotherapy by isolated perfusion in the treatment of melanoma of the extremities. *Plast Reconstr Surg Transplant Bull* 1961; 28:333-46.

177. Creech O Jr, Krementz ET, Ryan RF et al. Chemotherapy of cancer: regional perfusion utilizing an extracorporeal circuit. *Ann Surg* 1958; 148(4):616-32.
178. Kroon HM, Moncrieff M, Kam PC et al. Factors predictive of acute regional toxicity after isolated limb infusion with melphalan and actinomycin D in melanoma patients. *Ann Surg Oncol* 2009; 16(5):1184-92.
179. Filippo F, Giacomini P, Rossi CR, Santinami M, Garinei R et al. Hyperthermic isolated perfusion with tumor necrosis factor-alpha and doxorubicin for the treatment of limb-threatening soft tissue sarcoma: the experience of the Italian Society of Integrated Locoregional Treatment in Oncology (SITILO). *In Vivo* 2009 Mar-Apr; 23(2):363-7.
180. Kroon HM, Moncrieff M, Kam PC et al. Outcomes following isolated limb infusion for melanoma. A 14-year experience. *Ann Surg Oncol* 2008; 15(11):3003-13.
181. Quaglino P, Mortera C, Osella-Abate S, Barberis M et al. Electrochemotherapy with intravenous bleomycin in the local treatment of skin melanoma metastases. *Ann Surg Oncol* 2008; 15:2215-22.
182. Marty M, Sersa G, Garbay JR, Gehl J et al. Electrochemotherapy F An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *EJC Suppl* 2006; 4:3-13.
183. Mir LM, Gehl J, Sersa G, Collins CG et al. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator

- (TM) by means of invasive or non-invasive electrodes. *EJC Supplements* 2006; 4:14-25.
184. Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS et al. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 1999; 17(9):2745-51.
185. Chiarion Sileni V, Nortilli R, Aversa SM, Paccagnella A, Medici M, Corti L et al. Phase II randomized study of dacarbazine, carmustine, cisplatin and tamoxifen versus dacarbazine alone in advanced melanoma patients. *Melanoma Res* 2001; 11(2):189-96.
186. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):997-1003.
187. Falkson CI, Falkson G, Falkson HC. Phase II trial of fotemustine in patients with metastatic malignant melanoma. *Invest New Drugs* 1994; 12(3):251-4.
188. Nathan FE, Mastrangelo MJ. Systemic therapy in melanoma. *Semin. Surg. Oncol.* 1998, 14: 319-327.
189. Lee SM, Betticher DC, Thatcher N. Melanoma: chemotherapy. *Br. Med. Bull.* 1995, 51: 609-630.
190. Atkins MB. The treatment of metastatic melanoma with chemotherapy and biologics. *Curr. Opin. Oncol.* 1997, 9: 205-213.

191. Legha SS, Ring S, Papadopoulos N, et al. A prospective evaluation of a triple-drug regimen containing cisplatin, vinblastine and DTIC (CVD) for metastatic melanoma. *Cancer*, 1989, 64: 2024-2028.
192. Sertoli MR, Queirolo P, Bajetta E, et al. Multi-institutional phase II randomized trial of integrated chemo-immuno-hormonal therapy with cisplatin, dacarbazine, vindesine, subcutaneous interleukin-2, interferon alfa-2a and tamoxifen in metastatic melanoma. *Melanoma Res*, 1999, 9: 1-7.
193. Del Prete SA, Maurer LH, O'Donnell J, Forcier RJ, LeMarbre P. Combination chemotherapy with cisplatin, carmustine, dacarbazine, and tamoxifen in metastatic melanoma. *Cancer Treat Rep*. 1984 Nov; 68(11): 1403-5.
194. Casamassima A, Guida M, Latorre A, et al. Effects of subcutaneous recombinant IL-2 on hormonal immunity in advanced cancer patients. *Int. J. Oncol*, 1993, 3: 171-176.
195. Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol* 1996 Jan; 14(1):7-17.
196. Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Nitti D. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Nat Cancer Inst* 2010 Apr. 7; 102(7):493-501.
197. Wheatley K, Ives N, Eggermont A et al. Interferon-a as adjuvant therapy for melanoma: an individual patient data meta-analysis of randomised trials. *J Clin Oncol* 2007; 25(18S):8526.

198. Wheatley K, Ives N, Hancock B, et al. Does adjuvant interferon-alpha for high-risk melanoma provide a worthwhile benefit? A meta-analysis of the randomised trials. *Cancer Treat Rev* 2003; 29(4):241-52.
199. Melero J, Hervas-Strubbs S, Glennie M et al. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:95-106.
200. Hodi FS, O'Day SJ, Mc Dermott DF et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363:211-23.
- Mamalis A, Garcha M, Jagdeo J. Targeting the PD-1 pathway: a promising future for the treatment of melanoma. *Arch Dermatol Res.* 2014 Mar 11.
- Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010 Aug 26; 363(9):809-19.
- Ribas A, Kim KB, Schuchter LM et al. BRIM-2: An open-label, multicenter phase II study of vemurafenib in previously treated patients with BRAF V600E mutation positive metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2011; 29 (suppl):abstr 850.
201. Combination therapy approved for melanoma *Cancer Discov.*2014 Mar;4(3):262.
202. Guo J, Si L, Kong Y, Phase II, Open-Label, Single-Arm Trial of Imatinib Mesylate in Patients With Metastatic Melanoma Harboring c-Kit Mutation or Amplification. *J Clin Oncol* 2011 Jul 20; 29(21):2904-9.
203. Tong LX, Young LC. Nutrition: the future of melanoma prevention? *J Am Acad Dermatol.* 2014;71:151–60.

204. Ghattas S, Howle J, Wang W, et al. Intravascular metastatic melanoma: a difficult diagnosis. *Australas J Dermatol*. 2013;54:141–3.
205. Alcalay J. Lentigo maligna: a diagnostic and therapeutic challenge. *Harefuah*. 2014;153:259–60 306,305.
206. Robbins SL, Cotran RS. *Pathologic basis of disease*. Saunders. 2014; 9th ed.
207. Krishnan AV, Feldman D. Mechanism of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2011;51:311–36.
208. Brozyna AA, Jozwicki W, Janjetovic Z, et al. Expression of vitamin D receptor (VDR) decreases during progression of pigmented skin lesions. *Hum Pathol*. 2011;42:618–31.
209. Brozyna AA, Jozwicki W, Janjetovic Z, et al. Expression of vitamin D-activating enzyme 1 α -hydroxylase (CYP27B1) decreases during melanoma progression. *Hum Pathol*. 2013;44:374–87.
210. Micu E, Juzeniene M, Moan J. Comparison of the time and latitude trends of melanoma incidence in anorectal region and perianal skin with those of cutaneous malignant melanoma in Norway. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011;25:1444–9.
211. Lindqvist PG, Epstein E, Landin-Olsson M, et al. Avoidance of sun exposure is a risk factor for all-cause mortality: results from the Melanoma in Southern Sweden cohort. *J Int Med*. 2014;276:77–86.
212. Tang JY, Parimi N, Wu A, et al. Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study Group. Inverse association between serum 25(OH) vitamin D levels and non-melanoma skin cancer in elderly men. *Cancer Causes Control*. 2010;21:387–91.

213. Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med*. 2006;355:51–65.
214. Moan J, Porojnicu AC, Dahlback A, et al. Where the sun does not shine: is sunshine protective against melanoma of the vulva? *J Photochem Photobiol B*. 2010;101:179–83.
215. Moan J, Dahlback A. Ultraviolet radiation and skin cancer: epidemiological data from Scandinavia. In: Young AR, Young A, Bjorn LO, Moan J, Nultsch W, editors. *Environmental UV photobiology*. New York: Plenum Press; 1993. p. 255–93.
216. Dabouz F, Barbe C, Lesage C, et al. Clinical and histological features of head and neck melanoma: a population-based study in France. *Br J Dermatol*. 2014.
217. Grange F, Barbe C, Aubin F, et al. Clinical and sociodemographic characteristics associated with thick melanomas: a population-based, case–case study in France. *Arch Dermatol*. 2012;148:1370–6.
218. Osborne JE, Hutchinson PE. Clinical correlates of Breslow thickness of malignant melanoma. *Br J Dermatol*. 2001;144:476–83.
219. Grange F, Vitry F, Granel-Brocard F, et al. Variations in management of stage I to stage III cutaneous melanoma: a population-based study of clinical practices in France. *Arch Dermatol*. 2008;144:629–36.
220. Saw RP, Armstrong BK, Mason RS, et al. Adjuvant therapy with high dose vitamin D following primary treatment of melanoma at high risk of recurrence: a placebo controlled randomized phase II trial (ANZMTG 02.09 Mel-D). *BMC Cancer*. 2014;14:780.

221. Bikle DD. Vitamin D metabolism and function in the skin. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;347:80–9.
222. Hargrove L, Francis T, Francis H. Vitamin D and GI cancers: shedding some light on dark diseases. *Ann Transl Med.* 2014;2:9.
223. Holick MF. Evolution and function of vitamin D. *Recent Results Cancer Res.* 2003;164:3–28.
224. Berwick M, Armstrong BK, Ben-Porat L, et al. Sun exposure and mortality from melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:195–9.
225. Lee EY, Williamson R, Watt P, et al. Sun exposure and host phenotype as predictors of cutaneous melanoma associated with naval remnants or dermal elastosis. *Int J Cancer.* 2006;119:636–42.
226. Massad C, Loya A, Taraif S, et al. BRAF mutation status in primary and metastatic melanomas in two regions with differing potential ultraviolet radiation exposure. *Clin Exp Dermatol.* 2014;39:932–43.
227. Besaratinia A, Pfeifer GP. Sunlight, ultraviolet irradiation and BRAF V600 mutagenesis in human melanoma. *Hum Mutat.* 2008;29:983–91.
228. Qi RQ, He L, Zheng S, et al. BRAF exon 15 T1799A mutation is common in melanocytic nevi, but less prevalent in cutaneous malignant melanoma, in Chinese Han. *J Invest Dermatol.* 2011;131:1129–38.
229. Bauer J, Büttner 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.

230. Zou M, BinHumaid FS, Alzahrani AS, et al. Increased CYP24A1 expression is associated with BRAF(V600E) mutation and advanced stages in papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014;81:109–16.
231. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:684–700.
232. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, et al. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol.* 2006;24:4340–6.
233. Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, et al. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:806–12.