



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Dottorato di Ricerca in Salute dell'uomo

Ciclo XXIX

**I POLIMORFISMI GENETICI
NEL MELANOMA CUTANEO**

Relatore: Chiar.ma

**Prof.ssa Annamaria
Offidani**

Tesi di Dottorato del

Dott.Valerio Brisigotti

A.A. 2013/2016

INDICE

Introduzione.....	p.3
IL MELANOMA	
• Epidemiologia.....	p.6
• Fattori di rischio.....	p.9
• Patogenesi e biologia molecolare.....	p.22
• Classificazione molecolare del melanoma.....	p.31
• Precursori e caratteristiche cliniche.....	p.34
• Aspetti anatomo-patologici e fattori prognostici.....	p.40
• Diagnosi.....	p.55
• Escissione della lesione primitiva.....	p.58
• Stadiazione.....	p.59
• Terapia e follow-up.....	p.61
I POLIMORFISMI GENETICI	
• Significato, polimorfismi genetici e melanoma.....	p.76
STUDIO SPERIMENTALE	
• Obiettivi dello studio.....	p.88
• Materiali e metodi.....	p.89
• Risultati.....	p.96
• Discussione e conclusioni.....	p.112
BIBLIOGRAFIA.....	p.119

INTRODUZIONE

Il melanoma è un tumore maligno che origina dalla trasformazione neoplastica dei melanociti, cellule deputate alla produzione di melanina, presenti nello strato basale dell'epidermide, nei bulbi piliferi e più raramente nelle mucose, nell'occhio, nell'orecchio interno, nelle meningi e nella coroide.¹

La malattia, nella maggior parte dei casi, si configura inizialmente come intradermica per poi nelle forme invasive invadere il derma acquisendo la capacità di metastatizzare a distanza.^{2,3} Solo il 15% dei melanomi insorge in sede extracutanea; la malattia infatti colpisce prevalentemente l'ambito cutaneo configurandosi come tumore principe della cute.^{1,4}

Nel 25% dei casi il melanoma deriva dalla trasformazione maligna di nevi melanocitici pre-esistenti, nel restante 75% da trasformazione di melanociti da cute indenne da pre-esistenti lesioni.⁵ Negli ultimi cinquant'anni si è assistito ad un costante aumento di incidenza del melanoma pari al 5-7% annuo nella popolazione caucasica dei paesi industrializzati.¹

È una patologia che colpisce prevalentemente pazienti tra la terza e la sesta decade di vita, con un picco d'incidenza tra i 40 ed i 50 anni, potendo comunque manifestarsi a qualunque età.^{2,3}

È possibile annoverare il melanoma tra le neoplasie a più alto grado di malignità essendo infatti il tumore cutaneo che causa annualmente il più alto numero di decessi. Pur rappresentando appena il 4% dei tumori della pelle si rende responsabile dell'80% delle morti per neoplasia cutanea.⁶ Infatti il melanoma già da lesioni primarie relativamente piccole risulta dotato di alto potenziale di metastatizzazione; le localizzazioni secondarie più frequenti risultano essere polmone, fegato, cervello, linfonodi e osso, con drastico calo della sopravvivenza a 5 anni.⁷

Nonostante l'incidenza di questa neoplasia risulti ancora elevata nelle nazioni industrializzate, negli ultimi anni si è registrata un'iniziale stabilizzazione nel numero di nuovi casi. Tuttavia il dato non appare ancora uniforme, in relazione alla differente distribuzione nelle aree geografiche e nelle diverse fasce di età.^{3,7}

Questi dati, seppur ancora incompleti, sembrano suggerire che le campagne di screening e della diagnosi precoce si stiano dimostrando una strategia efficace nella lotta alla patologia. Permangono tuttavia alcune problematiche come il riscontro ancora di un numero elevato di lesioni localmente avanzate in alcune nazioni e la difficoltà ad estendere alle fasce di età più avanzate i benefici portati, dagli screening e dalla diagnosi precoce, raggiunti invece nei soggetti più giovani.^{8,9}

L'elevata incidenza e l'intrinseca aggressività della neoplasia dunque costituiscono ancora oggi ancora un'ardua sfida per il dermatologo e per l'oncologo.⁷

In quest'ottica risulta fondamentale implementare la prevenzione primaria ed estendere le campagne di screening alla popolazione di tutti i paesi e di tutte le fasce di età.

Risulta altrettanto importante la comprensione dei meccanismi genetici che predispongono alla malattia, che ne guidano l'evoluzione biologica e la resistenza ai farmaci ad oggi disponibili.

La conoscenza di questi fattori permetterebbe ai clinici di modulare la malattia fin dai primi stadi e di ritagliare per ogni paziente un percorso terapeutico basato sulla genetica individuale.

Per raggiungere questo traguardo grande impegno negli ultimi anni è stato profuso per approfondire le conoscenze riguardanti i fattori di rischio, la genetica e le vie di patogenesi molecolare della malattia. Le nuove conoscenze hanno profondamente modificato l'approccio del dermatologo e dell'oncologo alla patologia melanomatosa, che ad oggi viene considerata una neoplasia eterogenea, sia fenotipicamente che geneticamente. La più completa caratterizzazione genetica e molecolare ha permesso di comprendere i differenti comportamenti biologici del melanoma dai primordi della malattia fino alla fase avanzata. Questi studi hanno inoltre consentito la messa a punto di nuove terapie a bersaglio molecolare che hanno consentito di migliorare la sopravvivenza nei pazienti con melanoma metastatico, seppur ancora in maniera transitoria o ristretta a specifici sottogruppi di pazienti.⁵

Recenti studi di biologia molecolare hanno permesso di particolareggiare numerose sindromi e mutazioni genetiche già note ma mai pienamente caratterizzate. Inoltre hanno consentito di individuare nuove mutazioni predisponenti la malattia ed altre che concorrono invece nel modificare il decorso clinico della malattia o che inficiano la risposta a farmaci della terapia oncologica.¹⁰

Negli ultimi anni sono stati descritti numerosi polimorfismi genetici ereditari e mutazioni acquisite di specifiche molecole appartenenti alle principali vie di segnalazione intracellulare, che costituiscono fattori di rischio per lo sviluppo del melanoma e/o fattori favorenti la sua progressione o la mancata risposta a terapia.⁵

Lo studio di questi polimorfismi sta radicalmente cambiando l'odierno scenario e in futuro aprirà le porte a nuove possibilità terapeutiche.

Oggetto del presente studio è la verifica dell'esistenza di una possibile correlazione tra il comportamento biologico della malattia primitiva ed avanzata e la presenza all'indagine genetica di specifici polimorfismi genetici *rs3730089* del gene *PIK3R1* ed *rs2699887* del gene *PI3KCA*. I dati ottenuti sono stati posti in relazione anche con i fattori prognostici della popolazione analizzata. I polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) indagati rappresentano elementi cruciali delle vie molecolari implicate nella patogenesi, nella progressione e metastatizzazione del

melanoma. Il polimorfismo *rs3730089* del gene *PIK3R1* è noto in letteratura per il suo ruolo nell'aumentare il rischio d'insorgenza del carcinoma del colon; il polimorfismo *rs2699887* del gene *PI3KCA* conferisce invece un aumento del rischio di metastatizzazione a livello cerebrale nei pazienti affetti da carcinoma del polmone a piccole cellule (SCLC).^{11,12}

Una più ampia conoscenza del ruolo dei sovracitati SNP nella patologia melanomatosa, porterebbe benefici terapeutici e gestionali con un più corretto investimento di risorse.¹³

IL MELANOMA

EPIDEMIOLOGIA

L'incidenza del melanoma cutaneo è in costante incremento nelle ultime cinque decadi, soprattutto in paesi come Europa, Nord America, Australia e Nuova Zelanda.⁸

Le proiezioni future, elaborate secondo i dati acquisiti negli ultimi decenni, sembrano indicare che questo incremento persisterà per almeno un ventennio.¹⁴

La popolazione caucasica risulta essere più colpita rispetto ad altre etnie. Le aree a maggiore incidenza mondiale sono rappresentate da Australia e Nuova Zelanda, con un'incidenza nel 2012 pari a 34,9 casi su 100.000 abitanti per la prima e 35,8 casi su 100.000 abitanti per la seconda.¹⁵

Negli Stati Uniti d'America l'incidenza del melanoma cutaneo nel sesso maschile, nella fascia di età compresa tra 45 e 64 anni, è passata da 13,5 casi per 100.000 abitanti per anno del 1969 a 40 del 1999. Nella fascia "over 65" si è assistito ad un incremento ancora maggiore, passando da 18,8 casi per 100.000 abitanti per anno nel 1969 a 91 nel 1999.⁸

Questo incremento d'incidenza, risultato indipendente dallo status socio-economico, viene considerato in letteratura uno dei possibili indicatori del successo e della facilità di accesso allo screening.¹⁴

L'incidenza mondiale stimata per l'anno 2012, considerando entrambi i sessi, è stata di 232.130 casi (di cui 104.192 in Europa e 74.515 in Nord America); 120.649 sono stati gli uomini colpiti (il melanoma rappresenta dunque l'1,6% delle neoplasie del sesso maschile), e 111.481 le donne (1,7% delle neoplasie del sesso femminile). L'incidenza mondiale viene stimata in 3 casi su 100.000 persone per anno, senza distinzione per sesso (3,3:100.000 per l'uomo, e 2,8:100.000 per la donna).¹³ Si è inoltre assistito ad un iniziale arresto dell'incremento di incidenza in alcune aree dell'Europa occidentale; dati positivi non sono stati riscontrati nell'area dell'Europa dell'est e sud dove l'incidenza è tuttora in aumento.⁸

Per quanto riguarda la mortalità nel corso del 2012 a livello mondiale si sono registrate in totale 55.488 morti per melanoma cutaneo dei quali 31.390 morti nel sesso maschile e 24.098 in quello femminile. Sempre nel 2012 il melanoma cutaneo ha rappresentato lo 0,7% delle morti per neoplasia a livello mondiale con identica percentuale identica in entrambi i sessi; il dato sale a 1,3% delle morti per neoplasia se si considerano solamente le nazioni più sviluppate. È importante sottolineare che all'incremento stabile di incidenza registrato nelle aree economicamente sviluppate, non corrisponde equivalente incremento della mortalità, che rimane

sostanzialmente invariata dal 1980 per l'incremento di casi diagnosticati in stadio precoce, con malattia ancora curabile.¹⁴

I dati cambiano notevolmente se si prendono in considerazione le nazioni economicamente meno sviluppate, dove il melanoma cutaneo non figura nemmeno tra le quindici neoplasie ad incidenza e mortalità più elevate.¹⁵

La prevalenza del melanoma riportata per il 2012 è di 16,8 casi su 100.000 persone nei paesi in via di sviluppo, mentre sale a 53,9 casi 100.000 abitanti se si considerano solo le nazioni più sviluppate come ad esempio nord America o Europa.¹⁵

L'incidenza del melanoma rilevata nei due sessi risulta differente, il dato varia anche a seconda dell'area geografica considerata: in tutte le nazioni europee l'incidenza appare più alta nel sesso femminile rispetto al maschile, mentre tendenza opposta viene osservata in USA e in Australia.¹⁶

Nelle nazioni più sviluppate il melanoma cutaneo risulta essere l'ottava neoplasia per incidenza nel sesso maschile e la settima nel sesso femminile. Inversione di tendenza si può notare invece in Nord America ove il melanoma cutaneo si colloca al quinto posto per incidenza nell'uomo con una differenza di incidenza superiore al 50% secondo alcune stime.¹⁷

Per quanto concerne l'Europa il melanoma cutaneo rappresenta la decima neoplasia nel sesso maschile. I paesi Nord-europei presentano incidenza più alta rispetto ai paesi dell'area meridionale con 14,6 casi per 100.000 abitanti contro 8,1 casi per 100.000 abitanti.¹⁵

In Italia la patologia melanomatosa si colloca al settimo posto per incidenza con 11,1 casi per 100.000 abitanti nel il sesso maschile e di 11,7 casi per 100.000 nel sesso femminile.¹⁵

La situazione epidemiologica italiana sembra in linea con quella dei paesi più sviluppati, si rileva infatti un costante aumento d'incidenza del 3,6% annuo nel sesso maschile del 3,7% annuo nel sesso femminile. Questo aumento sembra essere in parte legato al sempre crescente impegno dei clinici nella diagnosi precoce grazie ad una maggiore diffusione degli strumenti diagnostici e delle campagne di screening ed in parte all'aumento delle conoscenze eziopatogenetiche che permettono adeguata prevenzione. Dai dati si evince che in Italia, ma anche in Europa, viene rilevato un gradiente geografico Nord-Sud, con valori massimi di incidenza nelle regioni del nord che diminuiscono del 18% per i maschi e del 12% per le donne residenti nelle regioni centrali e diminuendo anche del 50% a sud della penisola. Attualmente il melanoma cutaneo rappresenta la seconda neoplasia per incidenza nel sesso maschile in Italia nella fascia di popolazione che va da 0 a 49 anni rappresentando così il 9% delle neoplasie diagnosticate nelle prime cinque decadi di vita, preceduta solamente dal carcinoma testicolare. Nel sesso femminile rappresenta invece la terza neoplasia per incidenza nella stessa fascia di età, preceduta dai carcinomi mammario e tiroide. Anche la prevalenza della malattia presenta notevole variazione

nelle diverse aree geografiche italiane, con dati che variano da 192 casi per 100.000 abitanti del nord-ovest, a 179 casi per 100.000 del nord-est, a 157 casi per 100.000 del centro Italia e fino a 69 casi su 100.000 per il sud e per le isole. Se si distribuisce la prevalenza per fascia di età la proporzione dei pazienti colpiti oltre i 75 anni supera quella delle fasce di età inferiori rispettivamente con aumento percentuale del 13% rispetto alla fascia 60-74 anni e del 81% rispetto alla fascia 45-59anni.¹⁸

Secondo i dati Istat nel corso del 2011 in Italia si sono verificate 1054 morti per melanoma cutaneo nel sesso maschile e 753 nel sesso femminile; con una mortalità sostanzialmente invarista nei due sessi nell'ultimo decennio. Anche la mortalità appare variare a seconda dell'area geografica presa in esame con valori al sud inferiori del 24% nel sesso maschile e del 13% nel sesso femminile rispetto alle regioni del nord. Nelle regioni centrali però i dati risultano contrastanti, infatti si assiste ad una diminuzione della mortalità per melanoma analoga a quella riscontrabile nel sud per gli uomini, mentre il sesso femminile sembrano manifestare una mortalità superiore del 33% rispetto alle donne del nord. La sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi è aumentata del 14% nel sesso maschile e del 6% nel sesso femminile nel corso dell'ultimo ventennio assestandosi all'87% per gli uomini ed al 91% per le donne.¹⁸

Riassumendo i dati si desume come in Italia e nelle altre nazioni economicamente più sviluppate, per quanto riguarda l'incidenza del melanoma, sia riscontrabile uno incremento stabile e come risultino maggiormente colpiti gli adulti tra i 30 e i 60 anni di età. Sempre per quanto riguarda l'incidenza risulta presente una lieve predilezione della malattia per il sesso femminile. Inoltre, a dispetto dell'incremento numerico dei casi, la mortalità risulta stabile o in declino per la maggior parte dei paesi economicamente avanzati.^{8,14}

Alcune fonti individuano però una diversa tendenza nei dati per la fascia di età più anziana della popolazione; infatti anche in aree geografiche ove le campagne di screening e la diagnosi precoce sembrano funzionare efficacemente, per le altre fasce di età, si assiste ancora ad un incremento sia dell'incidenza che della mortalità. Esempio significativo è rappresentato dall'incremento del 3-4% annuo di quest'ultima tra gli over 80 australiani.¹⁹

Tali dati sono stati confermati anche da studi condotti in Europa, soprattutto per i soggetti di sesso maschile.^{9,20}

In occasione delle campagne di screening nazionali è stato rilevato come solo il 25% dei pazienti esaminati appartenga alla popolazione anziana. Il campione sembra dunque inadeguato, per garantire l'efficacia della campagna, visto che oltre il 44% delle nuove lesioni melanomatose insorgono in questa fascia di età e che è stato inoltre dimostrato come sia presente un incremento

dello spessore di Breslow, del livello di invasione di Clark e del riscontro di ulcerazione con l'aumentare dell'età.²¹

Da questi ultimi dati sembra importante sottolineare come, in termini di prevenzione, la popolazione anziana rappresenti un importante target su cui cercare di estendere i benefici della diagnosi in stadio precoce.⁸

FATTORI DI RISCHIO

L'eziologia del melanoma è ancora oggi oggetto di dibattito e discussione, ma alla base dell'insorgenza della neoplasia è stata riscontrata una combinazione di fattori di rischio costituzionali ed ambientali. Parte dell'incremento d'incidenza del melanoma cutaneo, sembra attribuibile ad un effettivo aumento del ruolo causale di alcuni fattori ambientali, come ad esempio l'esposizione alla radiazione UV, mentre la frazione di malattia attribuibile in misura preponderante a fattori genetici-fenotipici sembra rimanere stabile nel tempo. Tale frazione concorre circa al 10-15% dei melanomi cutanei secondo le attuali conoscenze.¹⁸

Per quanto riguarda i fattori di rischio costituzionali possiamo annoverare:²²

- 1- Fototipo I e II di Fitzpatrick,¹
- 2- Razza caucasica,⁸
- 3- Presenza di nevi congeniti giganti,²³
- 4- Presenza di un elevato numero di nevi melanocitici,¹⁶
- 5- Presenza di numerosi nevi atipici,²⁴
- 6- Presenza di anamnesi familiare positiva per melanoma,¹
- 7- Presenza in anamnesi personale di un precedente melanoma cutaneo,^{25,26}
- 8- Presenza di storia personale ed anamnesi familiare positiva per malattia di Parkinson,²⁷
- 9- Stati di immunodepressione.²⁸

Tra i fattori di rischio ambientali e comportamentali ad oggi riconosciuti annoveriamo:

- 1- Foto esposizione,¹
- 2- Fattori dietetici,²⁹
- 3- Sovrappeso–obesità,³⁰
- 4- Stile di vita e livelli sierici di leptina,³¹
- 5- Fattori occupazionali (fotoesposizione, PCB – policlorobifenili, uso di composti chimici in agricoltura, piloti e personale di bordo di aerei di linea,) ^{16-18,32,33}
- 6- Utilizzo di farmaci immunosoppressivi,³⁴

7- Utilizzo altri farmaci: sildenafil.³⁵

Caratteristiche fenotipiche

Numerosi studi epidemiologici pubblicati nel ventennio intercorrente tra il 1984 e il 2004, hanno valutato il peso dell'associazione tra caratteristiche fenotipiche del soggetto ed il rischio di insorgenza di melanoma cutaneo.³⁶ Tali risultati hanno dimostrato come i pazienti con fototipo di Fitzpatrick I rispetto a quelli con fototipo Fitzpatrick IV mostrano un rischio relativo di melanoma di 2.0.³⁶⁻³⁸

La meta-analisi di Olsen, analizzando i dati di 66 lavori internazionali pubblicati nel periodo tra il 1979 e il 2008, ha permesso di calcolare i rischi relativi dei pazienti raggruppati in pool secondo caratteristiche fenotipiche.

- 2,64 per soggetti con capelli rossi/rosso-biondi, 2,0 per quelli biondi e 1,46 per quelli castano chiaro nei confronti dei soggetti con capelli scuri,
- 1,57 per i soggetti con iride blu/blu-grigio, 1,51 per quelli verdi/grigi/nocciola verso quelli con occhi neri,
- 2,27, 1,99 e 1,35 per i soggetti con fototipo I, II e III rispettivamente verso il fototipo IV,
- 1,99 per i soggetti con efelidi rispetto a quelli senza.

Inoltre gli Autori hanno calcolato che il valore di Population Attributable Fraction (PAF) ovvero la quantificazione nella popolazione del contributo alla malattia di un singolo fattore di rischio, espressa come la riduzione percentuale della malattia che si osserverebbe nella popolazione in esame se quel fattore di rischio non esistesse, (*WHO, health statistics and information systems*) era del 27% per il fototipo I/II, del 23% per la presenza di efelidi, del 23% per il colore chiaro/biondo dei capelli, del 18% per gli occhi blu/blu-grigi e del 13% per gli occhi verdi/grigi/nocciola.³⁹

In conclusione, ci sono ragionevoli evidenze scientifiche per ritenere che i soggetti con pelle, occhi e capelli chiari e con foto-tipo I/II presentino un rischio di melanoma doppio rispetto ai soggetti con pelle scura/olivastra e con occhi, capelli scuri/neri e fototipo IV.^{36,39}

Sebbene lo *screening* di massa rappresenti il migliore presidio di prevenzione, esso non è sempre attuabile per via degli alti costi riferibili alla necessità, da parte di specialisti dermatologi, di esaminare tutti i soggetti di età superiore ai 16-18 anni. Risulta pertanto maggiormente applicabile uno *screening* mirato ai soggetti ad alto rischio (es: soggetti con familiarità per melanoma, caratteristiche fenotipiche, ecc...)³⁶

Nevi giganti congeniti

Per pazienti presentanti nevi giganti congeniti, nevi con diametro maggiore o uguali a 20 cm, il rischio di sviluppare melanoma varia dal 5 al 10% ed il rischio relativo di sviluppare melanoma risulta 2.000 volte maggiore rispetto al rischio della popolazione generale.^{23,24,}

Il rischio è determinato anche dal fatto che questi pazienti presentano voluminosi aggregati di melanociti in sedi profonde ed extracutanee, che possono andare incontro a cancerizzazione. Le sedi più frequentemente interessate da questi depositi sono: sistema nervoso centrale, il retro-peritoneo e la mucosa del tratto gastrointestinale.²⁴

È importante ricordare che i melanomi insorti in soggetti con nevi giganti congeniti tendono ad avere un esordio molto precoce, in molti casi anche prima della pubertà. In questi pazienti la prognosi risulta spesso peggiore, perchè la trasformazione neoplastica può spesso iniziare direttamente da cellule poste nel derma profondo e questo comporta una precoce invasione di vasi linfatici ed ematici, con conseguente facile metastatizzazione. Ulteriore problematica delle lesioni giganti è che spesso si collocano sulla linea mediana del corpo o la oltrepassano con la possibilità di coinvolgere multiple stazioni linfatiche di drenaggio.²³

Numero di nevi e di nevi atipici

Numerosi studi svolti in differenti aree geografiche come Nord America, Europa e Australia hanno confermato come un'elevata conta di nevi melanocitici rappresenti un fattore di rischio importante per lo sviluppo del melanoma cutaneo; è infatti stato dimostrato che un quarto dei melanomi cutanei insorge su nevi melanocitici pre-esistenti. La presenza di un numero elevato di nevi melanocitici depone anche a favore di una elevata fotoesposizione del soggetto, in quanto un elevato numero di nevi spesso risulta associato ad una storia di maggiore esposizione ai raggi UV.¹⁶

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative, per numero dei nevi nei due sessi, eccetto che per i nevi melanocitici del tronco, che risultano essere più numerosi nel sesso maschile.⁴⁰

La presenza di un numero elevato di nevi melanocitici sembra risultare il fattore di rischio fenotipico di maggior rilievo: una recente meta-analisi afferma che una conta di nevi melanocitici compresa tra 101 e 120, comporti un rischio relativo di 6.89 per lo sviluppo melanoma cutaneo rispetto ad una conta il cui numero risulti inferiore a 15.²²

Altre metanalisi rilevano che il 42% dei melanomi cutanei insorge in pazienti con un numero di nevi pari o superiore a 25; questo sembra essere il limite oltre il quale il rischio relativo si innalza sensibilmente.⁴¹

Studi effettuati sui gemelli omozigoti hanno dimostrato che il numero di nevi è prevalentemente determinato geneticamente, ma possono intercorrere influenze ambientali.²²

È stato inoltre recentemente documentato come l'espressione di polimorfismi di alcuni geni (es: MTAP e PLA2G6) si associ ad un numero maggiore di nevi melanocitici e ad un aumentato rischio di insorgenza di melanoma cutaneo.⁴²

Per quanto riguarda i nevi atipici, la metanalisi di Gandini del 2005 che individui con 5 o più nevi atipici posseggono un rischio relativo di sviluppare melanoma di 6,36 rispetto a chi ne è privo.³⁶

Dati ancor più recenti confermando il risultato precedente ed inoltre affermano che anche pazienti con un singolo nevo atipico presentano un rischio relativo di 3,63 di sviluppare un melanoma cutaneo.^{36,41}

La contemporanea presenza di nevi atipici e l'anamnesi familiare positiva per melanoma sembrano incrementano il rischio relativo di sviluppare la neoplasia.⁴¹

Ulteriore fattore di rischio è rappresentato dalla "sindrome del nevo displastico" (AMS: Atypical Mole Syndrome), caratterizzata dalla presenza di numerosi nevi displastici, che comporta un rischio da 6 a 22 volte maggiore di sviluppare un melanoma rispetto agli individui non affetti.⁴¹

La diagnosi di AMS è solitamente clinica ed in un numero elevato di casi associata alla mutazione germinale del gene CDKN2A. Inoltre i melanomi riscontrati in individui con diagnosi di AMS risultano insorgere precocemente rispetto alla popolazione generale ed in sedi meno comuni come cuoio capelluto, occhio ed anche in sedi extracutanee. È stato dimostrato anche un aumentato rischio di presentare melanomi multipli nel corso della vita.^{6,43}

Familiarità per melanoma

Il 10% dei pazienti affetti da melanoma riferisce in anamnesi un familiare di primo grado affetto dalla medesima patologia ed il 5% di tutti i melanomi cutanei insorge in pazienti con 2 o più familiari di primo grado affetti da tale patologia.^{24,16}

Attualmente si stima però che solamente 1-2% dei melanomi siano attribuibili ad un difetto genetico ereditato identificabile.^{24,44}

I recenti progressi di biologia molecolare hanno consentito un avanzamento nella possibilità di stimare quale sia il livello di rischio genetico del singolo individuo o in gruppi. Si ritiene che

alleli ad alto rischio per lo sviluppo di melanoma siano espressi in gruppi familiari ristretti, dove si riscontrano numerosi melanomi, mentre alleli che conferiscono un rischio più basso (es: polimorfismi genetici) possono più spesso essere riscontrati in casi sporadici.⁴⁵

Altri autori, data la sempre maggiore mole di dati disponibile nel campo della genetica del melanoma, preferiscono dividere le mutazioni genetiche in ad alta, intermedia o bassa penetranza. Queste ultime risultano possedere una prevalenza molto alta nella popolazione generale ma conferiscono un basso rischio per la patogenesi del melanoma, se prese singolarmente.⁴⁶

Per quanto riguarda gli alleli ad alto rischio il più studiato e caratterizzato è il gene oncosoppressore *CDKN2A*, localizzato al cromosoma 9p21, che codifica per 2 proteine deputate al controllo negativo del ciclo cellulare: p16ink4a e p14ARF. La mutazione germinale di questo gene è stata riscontrata nel 20-30% delle famiglie sospettate di avere una mutazione genetica predisponente al melanoma ereditario.^{26,45,47}

Recentemente è stata descritta un'ulteriore mutazione ad alto rischio, meno frequente rispetto alla precedente, che interagisce a livelli molecolari riguardando il proto-oncogene *CDK4*, codificato a livello di 12q14. Tale mutazione germinale altera il sito di aggancio della proteina che interagisce con p16, con conseguente simile deregolazione del ciclo cellulare.^{22,47}

Si stima che nelle famiglie con 3 o più soggetti affetti una percentuale variabile di soggetti, compresa tra il 20% ed il 40%, risulta positiva per mutazione germinale a carico di *CDKN2A*, mentre una percentuale <5% è portatrice di mutazione a carico del gene *CDK4*.³⁶

Queste mutazioni conferiscono un rischio genetico di sviluppare melanoma stimato tra il 20% e il 57%, per cui si ritiene probabile che possano esistere altri alleli ad alto rischio, ancora da caratterizzare.⁴⁵

Le mutazioni di *CDKN2A*, comportano forme mutanti di p16ink4a che non sono più in grado di inibire le chinasi ciclina dipendenti *CDK4* e *CDK6*; conseguentemente la proteina del retinoblastoma (RB) passa allo stato iperfosforilato, consentendo la transizione dalla fase G1 alla S del ciclo cellulare e la conseguente proliferazione.^{22,34,45,47}

La perdita della funzione di p14ARF si traduce invece in una perdita di funzione di p53, il principale oncosoppressore deputato al blocco del ciclo cellulare. Le due mutazioni presentano eredità autosomica dominante a penetranza incompleta.^{45,48}

La penetranza per la mutazione di *CDKN2A*, descritta dallo studio del GenoMEL (International Melanoma Genetics Consortium) che pone in analisi 80 famiglie da tre continenti differenti, è del 30% fino al compimento del cinquantesimo anno di età e del 67% fino all'età di 80 anni. Queste percentuali presentano una certa variabilità in base alla regione geografica, il che

testimonierebbe la possibile interferenza di fattori ambientali, e/o di altri geni modificatori coereditati.⁴⁵

È stato parallelamente osservato in altri studi che polimorfismi del gene per il recettore 1 della melanocortina (MC1R) e caratteristiche fenotipiche a rischio, possono aumentare la penetranza della mutazione aumentando il rischio di sviluppare malattia nei soggetti portatori. Il rischio sembra ancora più elevato per individui che ereditano in blocco più polimorfismi genetici ad alto rischio del recettore MC1R come ad esempio: V60L, V92M, R151C e R160W.⁴⁹

Negli ultimi anni sono state scoperte nuove mutazioni germinali, come quelle coinvolgenti i geni BAP1 e TERT, considerate ad alta penetranza ed ancora oggetto di studi per una più completa caratterizzazione epidemiologica.⁴⁶

Queste mutazioni sono state dimostrate responsabili dello sviluppo di casi di melanoma familiare, e per quanto riguarda BAP1, anche di sindromi più complesse, che comprendono lo sviluppo di melanoma cutaneo e molto spesso anche uveale, proliferazioni melanocitiche cutanee atipiche (dette “BAP-omi“), ed altre neoplasie maligne in vari organi, tra cui mesoteliomi e carcinomi renali, che delineano la sindrome “COMMON“ (Cutaneous-Ocular Melanoma, Melanocytic proliferations and Other internal Neoplasms).⁵⁰

La mutazione germinale di TERT, gene codificante per la subunità catalitica della telomerasi, è ad oggi ritenuta molto rara ma ad alta penetranza.⁵¹

Tale mutazione risulta al contrario molto frequente, come mutazione acquisita (somatica), nei melanomi sporadici dove insorge molto probabilmente a seguito del danno da esposizione ai raggi UV ed è infatti riscontrabile anche a livello di altre neoplasie cutanee come il carcinoma basocellulare e spinocellulare. In uno studio recente di Griewank la presenza della mutazione somatica di TERT in melanomi sporadici non localizzati alle estremità, risulta essere anche un fattore prognostico indipendente per quanto riguarda la sopravvivenza.^{52,53}

Mutazioni a penetranza incompleta che risultano in un maggiore rischio di melanoma sono quelle a carico dei geni MC1R e MITF (variante E318K).⁴⁶

Il gene MC1R presenta molti polimorfismi in numerose regioni, che sono responsabili di alcune caratteristiche fenotipiche comprese nel fototipo I di Fitzpatrick; infatti l’80% degli individui con queste caratteristiche presenta polimorfismi del gene MC1R. Tale fenotipo, come già accenato precedentemente, rappresenta un rischio per lo sviluppo del melanoma cutaneo, conferendo maggiore suscettibilità a fattori ambientali come l’esposizione UV.⁵⁴

D’altro canto alcuni studi, incentrati in particolare su nove polimorfismi del gene MC1R, riscontrano un rischio aumentato in questi individui che risulta in parte indipendente dalle caratteristiche fenotipiche, o dai fattori ambientali, suggerendo che a queste varianti genetiche

possano fare capo molteplici meccanismi di cancerogenesi. Ulteriori studi hanno portato alla scoperta che il polimorfismo E318K del gene MITF, codificante per un fattore di trascrizione che regola lo sviluppo dei melanociti, è presente in famiglie con multipli casi di melanoma, negative per mutazioni a penetranza maggiore (CDKN2A e CDK4), in una percentuale che varia dallo 0,8% al 7,4%. Il rischio dei portatori di tale polimorfismo di sviluppare un melanoma risulta 2,33 volte superiore rispetto alla popolazione generale ed è stata inoltre riportata anche una maggior tendenza allo sviluppo di melanomi multipli.⁴⁶

Risultati analoghi sono stati ottenuti per polimorfismi E318K del gene MC1R; tale variante risulta statisticamente associata ad un basso numero di nevi melanocitici ed all'assenza del colore blu dell'iride, e attribuisce con un rischio più alto ai pazienti con capelli di colore scuro o nero.⁵

Il rischio conferito appare dunque totalmente indipendente dalle classiche caratteristiche fenotipiche ed è probabile che nella cancerogenesi sia implicata una diversa attività del prodotto di trascrizione del gene.⁵⁵

Non è ad oggi stato ancora provato che tale polimorfismo sia associato ad una comparsa di melanomi cutanei in età più precoce rispetto a quanto avviene nella popolazione generale.⁵⁶

Gli alleli a bassa penetranza, per la predisposizione ereditaria al melanoma, comprendono 51 geni che regolano alcune caratteristiche importanti come la pigmentazione cutanea come la numerosità dei nevi melanocitici, la risposta immunitaria nei confronti di una eventuale neoplasia, la riparazione del DNA, il metabolismo di detossificazione di alcune sostanze e la funzione del recettore della vitamina D.⁴⁶

Si tratta in maggioranza di geni che sono interessati frequentemente da polimorfismi genetici ereditabili, per lo più polimorfismi a singolo nucleotide (SNP), che manifestano bassa penetranza per melanoma nei soggetti interessati, ma sono presenti con alta prevalenza all'interno della popolazione. La neoplasia in questi casi si manifesta in età più avanzata rispetto ai soggetti interessati dalle mutazioni CDKN2A e CDK4. Questi polimorfismi genetici comportano inoltre un rischio minore se considerati singolarmente rispetto alle mutazioni ad alta penetranza e subiscono un'influenza maggiore da parte dei fattori di rischio ambientali.^{46,57}

Sono stati indagati anche i polimorfismi del recettore della vitamina D, che presenta ben 196 polimorfismi a singolo nucleotide, è stato dimostrato che alcuni di essi (es: polimorfismo *FokI*) incrementano il rischio di melanoma cutaneo mentre altri (es: polimorfismo *BsmI*) lo ridurrebbero. Il polimorfismo *FokI* inoltre, se presente in omozigosi, sembrerebbe incrementare il rischio di insorgenza di melanomi cutanei del 21%, rispetto agli individui "wild-type".⁵⁸

Uno studio più recente ha confermato questi risultati, descrivendo un rischio aumentato di melanoma anche nei pazienti con polimorfismo *TaqI*, sia in eterozigosi ed ancora più in omozigosi.⁵⁹

Diagnosi precedente di melanoma

È noto da tempo che i pazienti che presentano una positività anamnestica per melanoma cutaneo, possiedono un maggior rischio di sviluppare un secondo melanoma cutaneo primitivo nel corso della vita.⁶⁰

Un recente studio ha dimostrato che un rischio maggiore è evidenziabile nei pazienti affetti dalla prima lesione ad un'età inferiore a 40 anni e che questa presentazione anticipata viene spesso condizionata da fattori genetici. Il rischio relativo di presentare un secondo melanoma nel corso della vita in questi pazienti è stimato a 15,1.⁶¹

Altri autori stimano un aumento del rischio di circa 9 volte rispetto alla popolazione generale.⁵ È stato inoltre dimostrato che una precedente diagnosi di carcinoma basocellulare o spinocellulare incrementa il rischio di melanoma di 3,6 volte. È parimenti dimostrabile l'associazione inversa, infatti una precedente diagnosi di melanoma incrementa il rischio di presentare successivamente una diagnosi di carcinomi basocellulari e spinocellulari. L'incremento del rischio d'insorgenza di un secondo melanoma permane ben oltre 10 anni dalla diagnosi del primo tumore, per cui il follow-up deve essere continuo, attento e prolungato.^{60,61}

Studi preliminari indicano che un una precedente diagnosi di melanoma, carcinoma basocellulare o squamocellulare, incrementa il rischio di una successiva diagnosi di neoplasia non cutanee come neoplasie del distretto testa collo e carcinoma pancreatico.⁶¹

Malattia di Parkinson e melanoma

La relazione tra malattia di Parkinson e Melanoma è ancora oggi oggetto di studio, ma studi preliminari sembrano dimostrare la significatività di tale presunta associazione, indicando che i pazienti affetti da Parkinson presentano un maggior rischio di insorgenza di melanoma.^{27,62} Infatti in un recente studio, comprendente 2.106 pazienti con malattia di Parkinson, il rischio relativo di insorgenza di melanoma rispetto alla popolazione generale è risultato essere 7 volte maggiore.⁶³

Il sesso, la durata di malattia neurologica e l'uso di levodopa non sembrano influenzare l'insorgenza di melanoma in pazienti affetti da parkinson; la levodopa in passato era sospettata di poter incrementare il rischio di melanoma, ma diversi studi ad oggi lo escludono.⁶³

Gao *et al.*, in uno studio che ha coinvolto 157.036 pazienti, afferma che anche una storia familiare positiva per melanoma possa predisporre allo sviluppo di malattia di Parkinson con un rischio relativo di 1,85. Numerosi dati ad oggi sembrano supportare la tesi dell'associazione tra le due patologie, ma il substrato molecolare del nesso rimane tuttora sconosciuto.⁶⁴

Recenti studi stanno focalizzando l'attenzione sulla α -sinucleina, una delle proteine maggiormente implicate nella patogenesi della malattia di Parkinson, che sembra essere espressa sia nelle lesioni nevriche che nel melanoma, ma non in cellule della cute sana o nei tumori della cute non melanoma. I dati sono però incompleti e ulteriori studi sono necessari per confermare un possibile ruolo della proteina nell'associazione tra le due patologie.⁶⁵

Fattori ambientali

La foto esposizione è ormai da tempo riconosciuta come il principale fattore di rischio nell'insorgenza del melanoma cutaneo.⁶⁶

È infatti noto che nelle popolazioni a fototipo chiaro l'incidenza del melanoma cutaneo varia a seconda della latitudine di residenza, con il massimo dei casi riscontrati in presenza di climi soleggiati: emblematico risulta l'esempio australiano.⁸

I fattori costituzionali come il fototipo e la tendenza a sviluppare nevi dopo la fotoesposizione, interagiscono sinergicamente con il rischio ambientale.⁶⁶

La fotoesposizione rappresenta un fattore di rischio in tutte le fasce d'età, ma l'esposizione in età infantile/adolescenziale comporta un rischio maggiore.^{24,66}

Per quanto riguarda la lunghezza d'onda, sia la radiazione UVA (320-400nm) che quella UVB (280-320nm) costituiscono un rischio.²⁴

Il DNA risulta particolarmente sensibile ai raggi UVB che, pur rappresentando la minima parte dello spettro che raggiunge la superficie terrestre, risultano capaci di danneggiare in maniera massiva ed efficace il materiale genetico. La formazione di specie reattive dell'ossigeno rappresenta invece il meccanismo principale di danno mediato dai raggi UVA. Le diverse lunghezze d'onda, per le proprietà ottiche dell'epidermide umana, penetrano in maniera differente nella cute con gli UVA che raggiungono una profondità maggiore rispetto agli UVB: in un individuo caucasico di fototipo I è infatti stimato che il 50% dei fotoni UVA raggiunga il derma rispetto al 1-10% degli UVB.⁶⁷

Dalla letteratura si evince inoltre che sia l'ustione solare, sia il numero di tali episodi durante la vita, sono identificati come episodi favorevoli. Infatti un'anamnesi positiva per storia di ustioni solari conferisce un rischio circa doppio di sviluppare melanoma; inoltre il rischio risulta ancora più elevato quando gli episodi di ustione sono avvenuti nell'infanzia rispetto all'età adulta.³⁶ Recenti studi affermano infatti che 5 episodi di ustione solare comportino un rischio doppio di sviluppare un melanoma.⁵

La fotoesposizione di tipo "acuto e intermittente" rispetto a quella "cronica e continua" sembra essere quella che predispone maggiormente allo sviluppo del melanoma cutaneo. Numerosi studi hanno dimostrato come persone con fototipo chiaro, che lavorano solitamente in ambienti chiusi ma che si recano in villeggiatura in località molto soleggiate, o che si espongono alla luce solare in maniera intensa ed intermittente, risultino particolarmente a rischio.^{36,68}

È stata recentemente indagata la possibile correlazione tra la modalità di esposizione solare in relazione alla sede anatomica colpita. Da questi studi è emerso che il ruolo dell'esposizione solare nella genesi del melanoma, cambia a seconda della zona esposta: un'esposizione cronica sembra correlare con l'insorgenza di melanomi della testa e del collo, mentre l'esposizione solare intermittente costituisce invece un fattore di rischio per lo sviluppo dei melanomi del tronco.⁶⁶

Anche l'uso dei lettini solari e delle lampade abbronzanti viene considerato un fattore favorevole allo sviluppo di melanoma; secondo i risultati di uno studio riguardante 100.000 soggetti attenti a tali pratiche, l'utilizzo delle suddette apparecchiature comporterebbe un rischio relativo di 2.58.^{69,70}

Studi più recenti confermano tali risultati e mostrano un aumento del rischio direttamente proporzionale al numero di esposizioni con apparecchiature UV *indoor*. I risultati appaiono analoghi considerando anche lettini solari e lampade abbronzanti di ultima generazione.⁶⁹

Recentemente l'International Agency for Research on Cancer (IARC) ha stabilito che l'abbronzatura ottenuta con lampade e/o lettini è cancerogena per l'uomo e dovrebbe essere evitata per ridurre il rischio di melanoma cutaneo.²⁴

Fattori dietetici

Mackie et al., mediante l'esecuzione di numerosi studi caso-controllo condotti tra il 1974 e il 1987 in Australia, hanno identificato nella dieta un possibile fattore di rischio per lo sviluppo del melanoma cutaneo. Veniva infatti riscontrato un aumento del contenuto medio di acidi grassi polinsaturi, soprattutto acido linoleico ed arachidonico, nei trigliceridi del tessuto adiposo sottocutaneo dei pazienti affetti. Studi dell'epoca avevano dimostrato come in un periodo di

incremento nell'incidenza del melanoma cutaneo fosse stato preceduto e poi accompagnato da un forte incremento nella dieta di acidi grassi polinsaturi (soprattutto linoleico ed arachidonico), contenuti in margarine, oli vegetali, cibi precotti ed altri alimenti in uso in tale periodo. Parimenti era stato anche dimostrato come un alto contenuto di acido linoleico nella dieta, comporti una veloce incorporazione di questo nelle membrane cellulari e un rapido incremento della sintesi di prostaglandine in tutto l'organismo: queste molecole risultano coinvolte nella progressione del melanoma e di altri tumori maligni. In base a tali evidenze gli autori concludevano considerarono l'eccessivo consumo di acidi grassi polinsaturi un potenziale fattore di rischio per lo sviluppo della patologia melanomatosa.²⁹

Recenti studi hanno tentato di spiegare tale correlazione dimostrando che la prostaglandina-E2, capace di incrementare la capacità invasiva delle cellule del melanoma, viene sintetizzata in quantità maggiori durante l'esposizione ad alte concentrazioni di acidi grassi tissutali ω -6.⁷¹

Ad oggi però non sono stati ripetuti studi che indaghino il rischio d'insorgenza di melanoma in funzione della composizione degli acidi grassi del tessuto adiposo sottocutaneo prelevato tramite biopsia. Il lavoro di Mackie *et al* seppure datato, rappresenta ad oggi l'unico tentativo in tale direzione.⁷²

Altri lavori hanno indagato invece la correlazione tra la presenza e composizione degli acidi grassi nel siero e il rischio d'insorgenza di melanoma ma non sono giunti a conclusioni univoche. Questi dati possono discordi possono essere imputati al fatto che la composizione del tessuto adiposo sottocutaneo rispecchia la dieta di un lungo periodo e risulta essere perciò più affidabile rispetto alle concentrazioni sieriche di lipidi, che si modificano invece più rapidamente in seguito a variazioni dietetiche.⁷³

Il consumo di alcol, soprattutto se abitudinario e in quantità moderata-elevata, viene ad oggi considerato un possibile fattore di rischio per l'insorgenza del melanoma cutaneo. I dati però non sono facilmente analizzabili poiché risulta complesso separare tale rischio da quello conferito dall'esposizione UV, anche in considerazione del fatto che molti pazienti riportano un aumentato consumo di alcolici durante attività di piacere all'aria aperta. È stato oltretutto rilevato che questo contribuisce alla genesi di più episodi di ustioni solari severe, per cui ad oggi il dato sul consumo di alcool non viene ancora considerato definitivo.⁷⁴

Anche l'obesità viene suggerita come fattore di rischio, soprattutto per quanto riguarda il sesso maschile. Gli elevato livello di leptina circolanti in pazienti sovrappeso, già noto fattore di rischio per altre neoplasie quali endometrio, mammella e colon, si sono dimostrati essere un fattore di rischio anche per l'insorgenza del melanoma.^{30,31}

La leptina infatti incrementa l'angiogenesi e la migrazione di alcuni tipi cellulari e può inibire l'apoptosi o agire come fattore di crescita. L'esercizio fisico sembrerebbe invece rappresentare un fattore protettivo per lo sviluppo del melanoma cutaneo.³¹

Dati sperimentali, su modelli murini di melanoma, sembrerebbero confermare infatti che elevati livelli circolanti di leptina stimolino la neoangiogenesi tumorale, mediante recettori che inducono la mobilitazione dei progenitori endoteliali dal midollo osseo, grazie all'attivazione della protein-kinasi AKT. I melanomi in tali animali sono risultati essere di maggiori dimensioni.⁷⁵

Bassi livelli circolanti di vitamina D erano erao in passato considerati un fattore di rischio per l'insorgenza del melanoma cutaneo ed una dieta ricca di vitamina D era considerata potenzialmente protettiva. Il pathway di segnalazione intracellulare conseguente all'attivazione del recettore della vitamina D risulta infatti implicato in numerosi processi, come apoptosi, risposta immunitaria e proliferazione cellulare.^{58,76}

Recenti metanalisi hanno però evidenziato come non sia ancora possibile ottenere un dato statisticamente significativo per quanto riguarda la correlazione tra livelli circolanti di vitamina D ed insorgenza di melanoma, ma affermano che possa essere descrivibile una relazione tra livelli di vitamina e spessore del melanoma alla diagnosi.⁷⁷

Ulteriori studi sembrano ad oggi necessari per confemare tali ipotesi.

Numerose molecole come il proantocianidine dei semi d'uva, l'epigallocatechina-3-gallato, il resveratrolo, l'acido rosmarinico, il licopene e il lattice di fico, sembrerebbero mostrare un effetto protettivo.⁷⁸

Anche il retinolo e polifenoli e gli acidi grassi ω -3 a lunga catena sembrano esercitare un effetto protettivo sull'insorgenza del melanoma cutaneo.⁷⁹

Immunodepressione e uso di farmaci immunosoppressivi

La correlazione tra l'immunodepressione e rischio d'insorgenza di melanoma è stato ampiamente inagato, soprattutto in pazienti che hanno subito un trapianto di organo.⁸⁰

Dopo trapianto per effetto della terapia immunosoppressiva iatrogena, il rischio di sviluppare carcinomi squamocellulari e basocellulari risulta incrementato di 250 volte rispetto alla popolazione generale. È stato anche riscontrato un aumento delle recidive di melanomi già trattati prima dell'intevento ed un incremento del rischio di insorgenza di nuovi melanomi.^{34,80}

È interessante notare che nel gruppo di pazienti pediatrici trapiantati le neoplasie cutanee rappresentano il secondo gruppo di tumori più frequenti nel post-trapianto ed il melanoma

rappresenta il 12% di queste. Inoltre la prognosi dei melanomi insorti dopo trapianto sembrerebbe essere peggiore soprattutto per le neoplasie a spessore di Breslow più elevato.⁸⁰

Anche i pazienti affetti da HIV/AIDS risultano soggetti ad un maggior rischio di insorgenza di melanoma cutaneo soprattutto se di fototipo chiaro. L'assunzione di farmaci antiretrovirali non sembra influenzare in alcun modo questi dati.²⁸

Anche il ruolo degli ormoni ed in particolare gli stati associati alla loro aumentata secrezione quali gravidanza e assunzione di terapie ormonali sostitutive, sono stati a lungo indagati al fine di valutarne l'influenza nell'insorgenza del melanoma.¹⁶

L'insieme degli studi oggi disponibili sull'argomento non consentono però di stabilire un nesso causale tra la gravidanza e melanoma, nè esiste alcun riscontro che la gravidanza rappresenti di per se un fattore peggiorativo della prognosi di un melanoma eventualmente già presente.^{16,81}

Tuttavia il melanoma rappresenta l'8% delle neoplasie maligne che affliggono la gravidanza.⁸¹ Recenti evidenze sembrano escludere inoltre un ruolo della terapia ormonale sostitutiva o della contraccettione ormonale orale nel favorire l'insorgenza del melanoma cutaneo.³⁶

È stato inoltre ipotizzato che alcune malattie infettive gravi contratte in giovane età e le vaccinazioni ripetute durante l'infanzia, ad esempio con bacillo di Calmette-Guerin (BCG), potrebbero giocare un ruolo protettivo verso l'insorgenza del melanoma cutaneo, anche nelle epoche successive della vita. Il meccanismo, probabilmente immunomediato, di questo effetto protettivo non è ancora completamente chiarito, ma sono in corso numerosi studi.^{18,82}

Anche gli antinfiammatori non steroidei (FANS) come l'acido acetil-salicilico, sono stati studiati nell'ottica di un possibile ruolo chemio-preventivo nei confronti dell'insorgenza del melanoma, come già riscontrabile in altri tumori, ad esempio nel carcinoma del colon-retto.¹⁶

Un recente studio ha infatti dimostrato l'effetto protettivo dell'aspirina ma non degli altri FANS. In particolare viene riscontrato un decremento del rischio di insorgenza di melanoma che ammonta al 21%, con beneficio che aumenta ulteriormente dopo 5 anni continuativi di assunzione.⁸³

Benefici sono stati ipotizzati anche per gli utilizzatori di statine che in vitro si sarebbero dimostrate dotate di attività antiproliferativa, proapoptotica ed immunomodulatoria nei confronti di linee cellulari di melanoma e capaci di possedere un effetto inibente le metastatizzazione in modelli murini.^{16,84}

Questa ipotesi non è stata però confermata da un studio del 2007 ma è stata comunque evidenziata una riduzione dello spessore di Breslow del 19% nella popolazione che faceva uso di statine.⁸⁵

I risultati di studi successivi non sembrano essere però concordi su tale dato ma hanno rilevato un miglioramento nella sopravvivenza cancro specifica a tre anni nei pazienti maschi assuntori di statine rispetto ai pazienti che non le utilizzano.⁸⁴

Benefici, nella sopravvivenza, sono stati ipotizzati anche per gli utilizzatori di farmaci beta-bloccanti sulla base del riscontro di un effetto anti-angiogenico ed anti-migratorio di questi farmaci in vitro sulle linee cellulari di neoplasie umane ed animali.⁸⁶

I dati in letteratura però non risultano univoci rispetto a tale ipotesi ma il dibattito rimane aperto.^{86,87,88}

PATOGENESI E BIOLOGIA MOLECOLARE

Il meccanismo patogenetico che sottende il melanoma risulta molto complesso ed ancora non del tutto chiarito. Si ipotizza che i melanociti accumulino lesioni genetiche in steps successivi, prima di essere in grado di formare una massa tumorale ed eventualmente metastatizzare a distanza. Alcune di queste mutazioni genetiche possono essere già presenti a livello germinale mentre altre vengono acquisite, determinando una combinazione di up-regulation e down-regulation di numerosi effettori molecolari a diversi livelli. Lo sviluppo di un tumore infatti può avvenire solo quando la cellula ha accumulato a livello genetico una serie di vantaggi nel suo accrescimento, principalmente attraverso mutazioni a livello di geni oncogeni e oncosoppressori.^{5,89}

Lo sviluppo della neoplasia è possibile solo dopo il sommarsi di multiple mutazioni, comportanti deregolazioni a livello cellulare, che avvengono con meccanismo genetico ed epigenetico e né determinano un fenotipo maligno. Per quanto riguarda i cambiamenti a livello genetico, gli oncogeni possono venire up-regolati da duplicazioni di interi cromosomi, amplificazione genica, traslocazioni e mutazioni puntiformi attivanti. Gli oncosoppressori possono essere inattivati dalla perdita di interi cromosomi, da ampie delezioni, da delezioni nel contesto del gene stesso o da mutazioni puntiformi. Le alterazioni epigenetiche sono invece, per definizione, cambiamenti nell'espressione dei geni che non sono causati da modificazioni della sequenza dei nucleotidi ma da modificazioni covalenti dei residui amminoacidici degli istoni, o cambiamenti nello stato di metilazione delle citosine. La metilazione del promotore di un gene si associa a silenziamento del gene stesso ed il silenziamento epigenetico di un gene oncosoppressore, ad esempio, a livello funzionale è equivalente ad una mutazione inattivante o delezione dello stesso gene. La modificazione dello stato di metilazione delle citosine avviene con maggiore frequenza nel contesto delle cosiddette "isole-CpG".⁹⁰ Le mutazioni coinvolte nel processo di cancerogenesi possono essere anche classificate come "driver" o "passenger": le prime contribuiscono

direttamente alla patogenesi della neoplasia, le seconde sono comunque accumulate durante la storia naturale della neoplasia, ma non contribuiscono direttamente al fenotipo maligno e non danno un vantaggio di sopravvivenza o moltiplicazione cellulare.⁹¹

Per quanto riguarda la patogenesi del melanoma cutaneo, i melanociti possono mostrare la tendenza a raggrupparsi in nidi, creando un nevo melanocitico, che può poi assumere caratteristiche definite come displastiche e successivamente andare incontro a trasformazione in senso melanomatoso. Nonostante ciò, istologicamente si rileva un nevo melanocitico preesistente solo in una parte dei melanomi cutanei.⁴⁶

I geni e le vie molecolari ad oggi maggiormente caratterizzate nella patogenesi del melanoma sono: **CDKN2A** (via p16^{CDKN2A}-CDK4-RB e p14^{CDKN2A}-MDM2-p53), **NRAS-BRAF** (via delle MAPK e PI3K-AKT tramite l'attivazione di NRAS) **cKIT** e **MITF**.³⁴ (Fig.1)

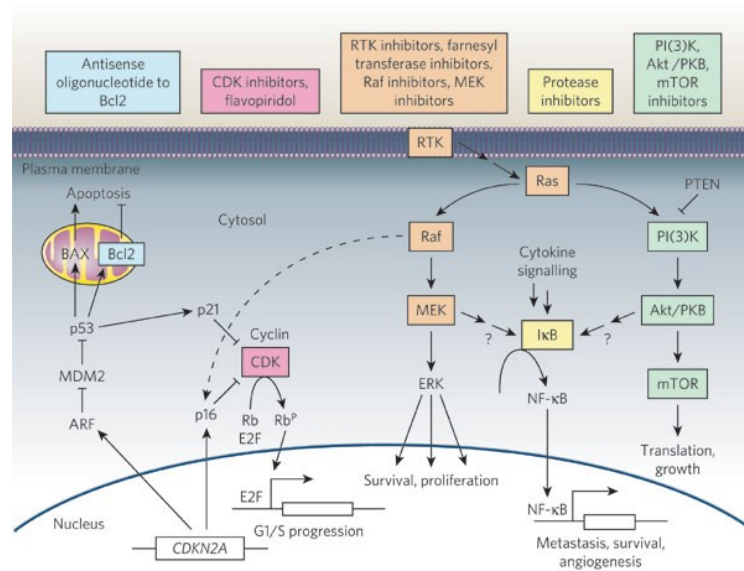


Figura 1: Principali vie molecolari implicate nella patogenesi del melanoma. Immagine da "Melanoma drugs and their target pathways." Vanessa Gray Schopfer, Claudia Wellbrock and Richard Marais Nature 445, 851-857(Feb.2007)

Si ritiene ormai da tempo che l'attivazione della via delle Map-kinasi (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*) rappresenti uno degli eventi iniziali cardine nella patogenesi del melanoma perchè capace di conferire una maggiore spinta proliferativa. Questa mutazione isolata non comporta però il completo sviluppo di neoplasia. Un secondo step fondamentale nella progressione di malattia è la perdita della funzionalità della via di CDKN2A (Cyklin Dependent Kinase Inhibitor 2A) che consente di inattivare programmi di senescenza cellulare a finalità oncosoppressive. L'attivazione della via della PI3K (Fosfatidil Inositolo 3 Kinasi), più comune

nelle cellule di melanomi più avanzati, conferisce invece maggiori capacità invasive e metastatiche alla malattia.⁹²

Le vie di segnalazione sovraccitate svolgono fisiologicamente numerose funzioni, tra le quali la produzione di melanina, sostanza fondamentale per assorbire le radiazioni ultraviolette e ridurre il danno al DNA UV-mediato. L'attivazione nei cheratinociti, in risposta al danno della radiazione ultravioletta, della proteina p-53 rappresenta lo step iniziale nel processo di produzione melanica. Tale attivazione incrementa la trascrizione della pro-opiomelanocortina (POMC), precursore di ormoni come l' α -MSH (α -Melanocyte Stimulating Hormone) e l'ACTH (Adreno Corticotropic Hormone). L' α -MSH legandosi al recettore MC1R (Melanocortin 1 Receptor) dei melanociti, genera un incremento di cAMP (Adenosina Monofosfato Ciclico) intracellulare, tramite il quale viene stimolata la trascrizione di MITF (Microphthalmia-associated Transcription Factor), mediatore essenziale anche per la produzione di melanina e per garantire il funzionamento dei melanosomi. I melanociti sono inoltre dotati di meccanismi anti-apoptotici che conferiscono resistenza al danno UV-mediato in condizioni fisiologiche. Il fattore di trascrizione MITF è il regista di questi meccanismi: i suoi livelli si alzano dopo esposizione alla radiazione UV, poichè media la trascrizione di geni anti-apoptotici BCL2, BCL2A1, ML-IAP e di geni implicati nella riparazione del DNA danneggiato.⁵

La patogenesi del melanoma risulta essere molto complessa in essa infatti fattori ambientali e genetici si embricano con fattori legati al microambiente cellulare e a fattori di crescita.⁹³

Inoltre i fibroblasti, lo stroma, l'apporto ematico e la risposta immunitaria svolgono un importante ruolo nel favorire o inibire la crescita, l'invasione ed il processo di metastatizzazione.⁴⁶

Numerosi fattori di crescita e mutazioni ad essi associate esplicano la loro funzione, attraverso vie molecolari a partenza da recettori tirosin kinasici di membrana, attivando cascate di segnale che coinvolgono principalmente NRAS, BRAF e la via PI3K che regolano positivamente la sopravvivenza e la proliferazione cellulare. Durante la trasformazione neoplastica gli oncosoppressori facenti capo al gene CDKN2A e regolatori del ciclo cellulare come p-53, possono risultare mutati o by-passati favorendo pertanto una proliferazione cellulare indipendente dal controllo fisiologico.⁴⁶

Le mutazioni di BRAF ed NRAS vengono ritenute mutazioni precoci nella patogenesi del melanoma ma se isolate non risultano sufficienti a generare una neoplasia invasiva. Devono pertanto necessariamente sommarsi altre mutazioni interessanti la stessa o altre vie molecolari⁹⁴. L'81% dei nevi melanocitici comuni manifesta infatti la mutazione di RAS mentre la mutazione BRAFV600E, la mutazione somatica di BRAF più frequente, è comunque presente nell'82% dei

nevi melanocitici acquisiti. L'attivazione di NRAS o BRAF isolata, genera quindi un iniziale stimolo proliferativo, che viene però contenuto da programmi di senescenza e di arresto di crescita, probabilmente come risposta protettiva, mediata dall'oncosoppressore CDKN2A, e da altri sistemi di controllo del ciclo cellulare.^{5,36} (Fig.2)

Modelli murini hanno dimostrato come da questo punto di partenza sono necessarie successive mutazioni, spesso interessanti geni oncosoppressori, per l'insorgenza del melanoma. Si ritiene che questo modello sia applicabile anche nell'uomo: circa l'80% dei melanomi, similmente a quanto riportato per i nevi melanocitici, presenta mutazioni o di BRAF o di NRAS come primo step. (Fig.2)

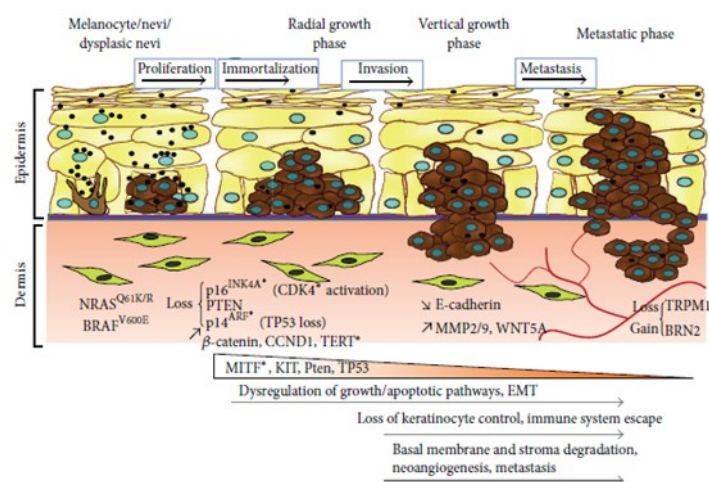


Figura 2: Modello di sviluppo ipotetico del melanoma (modello di progressione lineare). Immagine da "C.Bertolotto, Melanoma: From Melanocyte to Genetic Alterations and Clinical Options, 2013".

La mutazione di NRAS si calcola sia presente dal 15 al 30% dei casi di melanoma, mentre la mutazione di BRAF dal 50% al 70%. Entrambe possono attivare la cascata delle MAPKinas: RAS/RAF/MEK/ERK; a partire da questa via è anche possibile attivare il pathway della PI3K (vedi immagine 3). La mutazione di BRAF risulta fortemente associata all'esposizione solare intermittente in giovane età: i pazienti con mutazione di BRAF sono mediamente più giovani ed hanno un numero maggiore di nevi melanocitici. La mutazione di NRAS sembra invece correlare con una fotosposizione cronica e ad alti livelli.⁹³⁻⁹⁵

Per quanto concerne la famiglia delle proteine RAS, quella più frequentemente coinvolta nella genesi del melanoma è NRAS.⁸⁹

Gli effettori delle proteine RAS fanno capo a tre vie di segnalazione intracellulare: la prima a partenza dal legame RAS/RAF, attivante cioè la via delle MAP-Kinasi, la seconda a partenza dal legame RAS/PI3-Kinasi, che attiva la via di segnalazione intracellulare della fosfatidil-inositolo-

3-Kinasi, la terza a partenza dal legame di RAS con la proteina RAL-GEFS, che attiva una complessa via di segnalazione implicata nella crescita cellulare ancoraggio-indipendente e nella motilità cellulare.⁹⁶

La famiglia delle RAF-kinasi consiste di tre isoforme (ARAF, BRAF e CRAF) e tutte possono attivare diverse kinasi intracellulari. BRAF è la proteina più frequentemente coinvolta nel melanoma e nel 90% dei casi viene colpita dalla mutazione V600E (sostituzione della valina con acido glutammico in posizione 600). Tale mutazione genera una attivazione costitutiva di ERK, evento finale della via delle MAPKinasi, indipendente dalla presenza o meno di fattori di crescita a livello extracellulare o della attivazione iniziale di RAS. Questo culmina nella trascrizione di geni crescita-correlati che stimolano la proliferazione.⁸⁹

Le mutazioni di BRAF si verificano più spesso nei siti anatomici esposti episodicamente a livelli intensi di radiazione UV e sono molto più rare nei siti non esposti, quali le mucose. Il ruolo dei raggi UV come agente causale non è comunque definitivamente chiarito, in quanto spesso le lesioni differiscono dai tipici dimeri di pirimidine, la mutazione più spesso correlata e riconducibile alla fotoesposizione.⁶⁷

L'attivazione di vie molecolari a partenza da NRAS/BRAF, se accompagnata da alcuni eventi che si ritengono essere più tardivi nella patogenesi del melanoma, come l'attivazione di alcuni fattori di trascrizione (TWIST1 ed altri) e dalla perdita di E-Caderine, è implicata anche nella transizione epitelio-mesenchimale che comporta un incremento delle proprietà di invasione e metastatizzazione e cattiva prognosi.⁵

L'inattivazione degli oncosoppressori p16INK4a e p14ARF, codificati dal gene CDKN2A, è evento molto frequente. Risulta presente a livello germinale nel 20-40% dei casi di melanoma familiare, ma è anche un evento che si aggiunge alle mutazioni già citate in precedenza come alterazione somatica, acquisita durante la progressione del melanoma. Il 50% dei melanomi infatti presenta la perdita dell'espressione di p16INK4a ad esempio, ed i prodotti del gene CDKN2A possono non essere riscontrabili o essere funzionalmente non attivi sia a causa di mutazioni genetiche, che a causa di alterazioni epigenetiche come l'ipermetilazione presente nel 10-20% dei melanomi.⁹²

CDKN2A può essere anche danneggiato dall'azione cancerogena dei raggi UV, sono state infatti spesso rilevate mutazioni tipiche da danno da UVB nel contesto del gene ed è tra l'altro dimostrato che una prima mutazione di CDKN2A rende meno efficiente il meccanismo di riparazione a successivi danni da UV innescando, potenzialmente, un meccanismo vizioso, che porta all'accumulo di mutazioni genetiche.⁶⁷

È stato dimostrato come la perdita di p16INK4a permetta di by-passare il programma di senescenza cellulare, volto a prevenire la proliferazione di cellule a rischio di trasformazione neoplastica e come la reintroduzione della sua espressione in cellule di melanoma generi differenziazione cellulare ed una regolazione negativa della proliferazione.⁵

La perdita della funzione di p16INK4a promuove l'attivazione delle Kinasi ciclina dipendenti CDK4 e CDK6, che comporta un'iperfosforilazione della proteina del retinoblastoma (pRB) e l'attivazione del fattore di trascrizione E2F1. Questo evento media la trascrizione di geni responsabili del passaggio alla fase S del ciclo cellulare, promuovendo in sintesi la proliferazione.^{5,96}

Inoltre la perdita dell'oncosoppressore PTEN (Phosphatase and Tensin homolog), in aggiunta alle mutazioni iniziali già descritte, favorisce ulteriormente la progressione neoplastica, mediante l'attivazione della via della PI3K.⁵

La perdita di PTEN può avvenire mediante mutazioni inattivanti, ma molto spesso anche attraverso modificazioni epigenetiche, con ipermetilazione del promotore del gene, presente nel 62% dei casi.⁹²

Le mutazioni NRAS E BRAF sono in genere mutuamente esclusive, tranne rare eccezioni. Ad oggi le mutazioni di NRAS coesistono nel 9% con mutazioni attivanti la via della PI3K, mentre la compresenza di mutazioni di BRAF e PTEN è riportata nel 17% dei casi.⁵

Il fattore di trascrizione MITF (Microphthalmia-associated Transcription Factor) gioca, come già in parte discusso, un importante ruolo nella trascrizione di geni fondamentali in molti processi fisiologici e patologici del melanocita, come la sopravvivenza dei melanoblasti della cresta neurale, la sopravvivenza del melanocita a fronte di danno UV, l'inibizione dell'apoptosi, la migrazione cellulare e la proliferazione. Secondo il modello attuale, il livello di espressione di MITF è correlato a vari fenotipi cellulari, un decremento transitorio di espressione, ma non l'assenza totale di espressione, correla a caratteristiche assimilabili a quella di cellula staminale, livelli di espressione moderati correlano con una fase di proliferazione cellulare, alti livelli sono invece associati a differenziazione. L'inibizione sostenuta di MITF si associa alla senescenza cellulare. Nella patogenesi del melanoma, MITF può essere mutato sia a livello germinale che somatico. L'amplificazione del gene di MITF si ritrova ad esempio nel 10% dei melanomi primitivi, e nel 20% di quelli metastatici, ed è correlata ad una sopravvivenza a 5 anni peggiore per il paziente, conferendo alla neoplasia una maggiore capacità metastatica.⁵

Fattori di trascrizione della stessa famiglia di MITF sono implicati nella patogenesi di altre neoplasie (carcinomi MiT-correlati) che condividono la refrattarietà alle terapie tradizionali, ed una prognosi negativa in caso di malattia non chirurgicamente curabile.⁹⁷

Per quanto riguarda il gene KIT, esso codifica per un recettore trans-membrana ad attività tirosin-kinasica, che lega il fattore di crescita delle cellule staminali SCF. L'attivazione di questa via di segnalazione intracellulare media la crescita cellulare, la proliferazione, l'invasione, la metastatizzazione e l'inibizione dell'apoptosi. Questo pathway, di solito attivo durante l'embriogenesi, viene riattivato in più della metà dei melanomi in stadio iniziale, ma molto spesso questa caratteristica viene persa durante la progressione neoplastica, soprattutto nei melanomi metastatici. Questo dato suggerisce che KIT possa detenere avere anche un'attività oncosoppressiva in circostanze ancora da delineare. È possibile riscontrare una stabile attivazione di KIT da parte di mutazioni genetiche solo nel 2-6% dei melanomi cutanei, ma percentuali maggiori si riscontrano nei melanomi acrali, della cute esposta cronicamente al danno attinico e nei melanomi delle mucose. Molto spesso nei melanomi che hanno mutazioni di BRAF o NRAS, l'espressione di KIT è ridotta, e questo sembra facilitare la progressione neoplastica. D'altra parte è possibile identificare un sottogruppo di melanomi cutanei, negativi per mutazioni di BRAF o NRAS, che over-esprimono sia KIT che CDK4 come principali step per quanto riguarda la patogenesi del melanoma.⁵

Il gene oncosoppressore p-53 codifica per il fattore di trascrizione omonimo, che viene attivato dopo vari stimoli, come ipossia, danno al DNA o espressione di oncogeni, e controlla molti processi cellulari come l'apoptosi, la riparazione del danno al DNA, il metabolismo cellulare e la senescenza. P-53 regola negativamente l'hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), fattore di trascrizione che aumenta l'invasività delle cellule neoplastiche, p-53 inoltre può reprimere il processo della transizione epitelio mesenchimale, cruciale per l'acquisizione, da parte delle cellule neoplastiche, di un fenotipo con maggiori capacità metastatiche.⁹⁸

Il 50% delle neoplasie umane presenta mutazioni e delezioni di questo gene, ma nel melanoma sorprendentemente la percentuale è molto bassa (5% dei melanomi primari, e fino al 25% dei metastatici). Molti dei melanomi che mostrano mutazioni di p-53, non hanno comunque mutazioni di altri oncosoppressori rilevanti, come CDKN2A questo sta ad indicare che la mutazione di p-53, se presente, è sufficiente allo sviluppo della neoplasia. Recentemente è stato riscontrato che pur in assenza di mutazioni del gene p-53, in numerosi melanomi, sia primari che metastatici, la sua funzione viene comunque by-passata, grazie all'iperespressione di proteine come MDM2 (Mouse Double Minute 2 homolog) e MDM4, responsabili della degradazione di p-53 e di conseguenza dell'incremento delle proprietà di crescita, invasione e di metastatizzazione della neoplasia.⁵

Sia il melanoma che le cellule stromali nel contesto della neoplasia, esprimono metalloproteasi (MMP), cioè endopeptidasi zinco-dipendenti che si occupano principalmente del rimodellamento della matrice extracellulare.⁹⁹

Sono state riscontrate diverse MMP (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-14, MMP-15, MMP-16), e loro inibitori tissutali, denominati “TIMP”, acronimo di “Tissue Inhibitor of Metalloproteinase”, tra le quali TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3. Recenti studi hanno dimostrato come il bilancio funzionale tra MMP e TIMP sia importante nel determinare la progressione tumorale; la presenza di una netta iperespressione delle MMP correla con una maggiore densità microvascolare, con l’espressione di geni anti-apoptotici, e con un fenotipo maggiormente invasivo e metastatizzante da parte delle cellule neoplastiche. Le MMP maggiormente coinvolte nella progressione del melanoma sono la MMP-2 e MMP-9. L’espressione della MMP-2 da parte delle cellule neoplastiche correla positivamente con la diffusione metastatica e con ridotta sopravvivenza. L’espressione della MMP-9 risulta maggiore durante la fase di crescita orizzontale del melanoma, per cui la sua espressione sembra essere una delle più precoci; è dimostrato inoltre che nel melanoma la presenza di MMP-9 dipende dall’attivazione della via della PI3K.^{5,100}

L’espressione di metalloproteasi da parte delle cellule tumorali è maggiormente concentrata nell’interfaccia tra la porzione più infiltrante del tumore e lo stroma circostante. Anche cellule non neoplastiche, che comunque partecipano al processo di progressione, esprimono importanti livelli di MMP, come le cellule endoteliali che prendono parte al processo di neoangiogenesi: tali enzimi sono infatti necessari a garantire la migrazione attraverso la matrice extracellulare, durante la formazione dei neovasi. Le MMP ed i TIMP possono anche agire come regolatori di vie di segnalazione intercellulare, mediando il clivaggio di citochine e fattori di crescita, implicati nello sviluppo della rete vascolare e nel suo mantenimento.¹⁰⁰

Transizione epitelio-mesenchimale (EMT)

Il processo di transizione epitelio-mesenchimale (EMT) è fisiologicamente attivo durante l’embriogenesi ma viene anche sfruttato dalle cellule neoplastiche, che attraverso la riattivazione di meccanismi biologici ben conservati trasformano il loro fenotipo da cellule epiteliali, immobili ed ancora dotate di adesività, in cellule che mostrano un fenotipo mesenchimale, dotate cioè della capacità di invadere e migrare in siti distanti dalla sede di origine dando il via al processo di metastatizzazione.⁹⁸

Alcune cellule, mediante questa trasformazione, possono anche acquisire proprietà che le rendono assimilabili a cellule staminali, dotate di alta resistenza ai trattamenti chemioterapici. Il programma genetico che guida la EMT viene attivato attraverso l'aumentata espressione di alcune proteine (SNAIL/SNAI2, SLUG, ZEB1, ZEB2/SIP1, TWIST, E47) che funzionano da fattori di trascrizione, attivando e silenziando una serie di geni al fine di promuovere la migrazione cellulare e diminuire l'espressione di molecole di adesione come le E-caderine.^{5,98}

La EMT si associa all'aumentata espressione di N-caderine, che si legano efficacemente alle cellule endoteliali, promuovendo l'invasione vascolare da parte delle cellule neoplastiche.¹⁰¹

Il melanoma in questo processo risulta particolarmente efficiente, infatti è dimostrata l'espressione da parte dei melanociti trasformati di antigeni simili a quelli delle cellule endoteliali e di molecole di adesione, come L1CAM, espressa sia dall'endotelio che dai melanociti. L'espressione di questa molecola sembra incrementare quantitativamente dal melanocita del nevo displastico, fino al melanoma invasivo e metastatico.⁷

Altre molecole importanti durante il processo di invasione e progressione sono le integrine, maggiormente espresse nel melanoma particolarmente a livello degli pseudopodi utilizzati dalle cellule durante l'invasione vascolare.⁷ Il processo della EMT viene modulato da diverse molecole di segnale e fattori di crescita quali TGF- β , EGF, FGF, HGF, bone morphogenetic proteins BMP, Notch). Il TGF- β ad esempio è capace di favorire il processo della EMT attraverso la trascrizione di geni specifici. L'espressione e la secrezione di TGF- β inizia precocemente durante la progressione del melanoma, ma incrementa durante tutto il processo ed alti livelli sono associati a spessori maggiori e ad un fenotipo cellulare invasivo. Il TGF- β , attraverso una complessa via di segnalazione, è anche in grado di incrementare la traslocazione nel nucleo di β -catenina, evento che dà il via alla trascrizione di molti geni implicati nella progressione del ciclo cellulare (tra cui ciclina D1 e MITF) o nella inibizione della funzione di p16INK4a. Il 30% dei melanomi presenta attivazione di questa via, che interagisce però in maniera complessa e non ancora del tutto chiarita con il processo di progressione del melanoma. Tra le varie vie di segnalazione implicate nella EMT, la via della PI3K può contribuire a innescare il processo nelle cellule del melanoma attraverso vari effettori, quali kinasi AKT (che in modelli animali promuove il passaggio da fase di crescita radiale a verticale), RAC1 (Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1), GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 Beta). Questi elementi, tramite vari meccanismi, incrementano la degradazione di p53, che rappresenta un ostacolo all'attuazione della EMT, ed aumentano l'espressione di SNAIL e SLUG, due fattori di trascrizione chiave per l'attivazione del processo della EMT. Tutto questo conferma come la via

della PI3K possa conferire al melanoma caratteristiche di maggiore invasività, resistenza all'apoptosi e facilitarne la metastatizzazione.⁵

Nuove scoperte stanno rapidamente arricchendo le conoscenze di biologia molecolare nel campo della patogenesi e progressione del melanoma, ampliando lo spettro dei processi noti: è ormai noto come modificazioni genetiche ed epigenetiche contribuiscano allo sviluppo del melanoma. Recentemente anche eventi post-trascrizionali, nello specifico la perturbazione dell'espressione dei micro-RNA cellulari (miRNA), si sono aggiunti come possibile tappa dello sviluppo di numerose neoplasie, tra le quali il melanoma. Lo studio dell'espressione dell'enzima ADAR1 (Adenosina Deaminase Acting on RNA 1) in cellule melanomatose, ha dimostrato come l'assenza di tale enzima sia frequente nelle neoplasie metastatiche, ma non negli stadi precedenti della malattia.¹⁰²

Questo enzima converte l'adenosina in inosina su varie tipologie di RNA, compresi i miRNA, che in seguito a questo non terminano il loro percorso di maturazione e vengono quindi degradati o modificano la propria specificità di bersaglio.¹⁰³

L'enzima ADAR1 nelle cellule di melanoma contribuisce a regolare l'espressione di più di 100 geni, tramite la sua influenza su almeno 131 miRNA e la sua azione non si limita al semplice "editing" dei filamenti di RNA, ma è capace di condizionarne la maturazione con vari meccanismi. La perdita di questo enzima, riscontrabile nelle cellule di melanoma avanzato, è attribuibile all'azione di altri due miRNA, che legandosi all'mRNA codificante per ADAR1, ne abbassano i livelli. Infatti i miRNA, una volta maturati in frammenti a singolo filamento biologicamente attivi, agiscono principalmente legandosi agli mRNA della proteina da reprimere, inibendone la traduzione in polipeptidi ed accelerandone la degradazione.¹⁰⁴ L'incrementata espressione dei due miRNA che down-regolano ADAR1, è dovuta principalmente ad amplificazione dei geni che codificano per essi, ed alla loro ipometilazione, per cui entrano in gioco ancora una volta sia meccanismi genetici che epigenetici. La perdita dell'espressione di ADAR1 nelle cellule di melanoma metastatico è un evento comune, e contribuisce ad incrementare la progressione nel ciclo cellulare e la proliferazione, mutando anche l'aspetto morfologico delle cellule maligne, che assumono aspetto fusiforme, con emissione di pseudopodi. In modelli animali la perdita dell'enzima genera melanomi a rapida crescita, invasivi e con ampia necrosi centrale.¹⁰²

CLASSIFICAZIONE MOLECOLARE DEL MELANOMA

La conoscenza della patogenesi del melanoma e delle sue numerose alterazioni molecolari che lo rendono una neoplasia molto eterogenea, ha permesso di definire una classificazione molecolare, con l'obiettivo di identificare sottogruppi di pazienti che possano beneficiare di comuni strategie terapeutiche.^{24,105}

Tale approccio permette inoltre di superare i limiti di una classificazione esclusivamente morfologica delle varie tipologie di melanoma non sempre correlabile alla prognosi o alle nuove opzioni terapeutiche. L'attuale schema classificativo molecolare del melanoma prevede l'integrazione di dati riguardanti lo status mutazionale della neoplasia, con dati correlabili alla fotoesposizione.^{105,106} (Figura 6)

Frequency	Type of melanoma	Genetic/molecular test
~5%	Uveal	$cKIT^{mut} + cKIT^{ampl} + GNAQ/GNAI1^{mut}$
~5%	Mucosal	$cKIT^{mut} + cKIT^{ampl} + CCND1^{ampl} + CDK4^{ampl} + BRAF^{mut}$
~10%	Acral	$cKIT^{mut} + cKIT^{ampl} + CCND1^{ampl} + CDK4^{ampl} + BRAF^{mut} + NRAS^{mut}$
~15%	CSD	$CCND1^{ampl} + CDK4^{ampl} + p53^{exp} + cKIT^{mut} + cKIT^{ampl} + BRAF^{mut} + NRAS^{mut}$
~65%	Non-CSD	$BRAF^{mut} + NRAS^{mut} + AKT3^{exp} + PTEN^{exp} + p16^{exp} + CDK4^{amp} + MITF^{amp}$

Figura 3: Caratterizzazione molecolare delle principali tipologie di melanoma, in nero le alterazioni più comuni, in rosso le più rare, AMP: amplificazione genica, EXP: alterato livello di espressione della proteina rilevato con metodo immunohistochimico, MUT: mutazione genetica, CSD: aree con danno attinico cronico.

Palmieri et al. Targeted Therapies in Melanoma: Successes and Pitfalls, 2013.

I melanomi cutanei che insorgono in zone associate a foto esposizione episodica, sono caratterizzati nel 50% dei casi da mutazioni di NRAS o BRAF. Nel 90% dei casi la mutazione di BRAF è V600E mentre nel 16% la mutazione è la V600K. La seconda mutazione correla con un'esposizione solare cronica, melanoma localizzato a livello del distretto testa/collo ed in pazienti più anziani. Solo nel 3% dei casi la mutazione di BRAF è rappresentata dalla V600G/R.²⁴

Nelle zone sottoposte a danno attinico cronico, con marcata elastosi, la mutazione di BRAF è meno frequente. I melanomi che insorgono in zone con danno attinico cronico dimostrabile infatti sono caratterizzati dalla mutazione di NRAS nel 30-40% dei casi, o di KIT, che è presente nel 28% di questi.^{24,105}

La mutazione di KIT è presente anche in melanomi insorti in zone non fotoesposte come le mucose o le zone acrali: il 36% dei melanomi acrali possiede la mutazione di KIT, contro il 39% dei mucosali. Al di fuori di queste sedi caratteristiche, nel melanoma cutaneo ed in zone non cronicamente fotoesposte, la mutazione di KIT è molto rara (2-5% dei casi).⁵

Attualmente quindi la ricerca dello status mutazionale per BRAF o NRAS è utilizzata ogni volta che si vuole classificare la neoplasia dal punto di vista molecolare per stabilire l'appropriatezza, nel singolo paziente, dei nuovi regimi di target therapy.¹⁰⁵

Generalmente le mutazioni di BRAF o NRAS sono mutualmente esclusive, per cui in caso di BRAF non mutato, è indicata la ricerca di mutazioni di NRAS, presenti nel 20% dei melanomi.²⁴ Circa il 70% dei melanomi risulta positivo per una delle due mutazioni; nella rimanente percentuale dei casi le mutazioni responsabili della progressione neoplastica rimangono sconosciute.¹⁰⁷

Tuttavia oltre all'attuale classificazione molecolare del melanoma basata principalmente su BRAF, NRAS e KIT, vanno delineandosi nuove alterazioni genetiche implicate nella genesi del melanoma non routinariamente ricercate in quanto ancora oggetto di completa definizione. Tra queste va menzionata l'amplificazione del gene CCND1 (gene della ciclina D1), localizzato in posizione 11q13, che risulta in alcuni casi coesistere con la mutazione di BRAF o NRAS, conferendo alla neoplasia maggiore tendenza all'ulcerazione e all'invasività.¹⁰⁸

Più di recente è stato riscontrato in oltre la metà dei melanomi positivi per mutazioni attivanti di BRAF, anche la perdita di espressione di PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog), con conseguente *up-regulation* della via della PI3K ed attivazione della protein kinasi AKT. Attualmente non sono disponibili approcci terapeutici efficaci in caso di "melanomi triplo-negativi", ovvero melanomi negativi per mutazioni di BRAF, NRAS e c-KIT.¹⁰⁵

Recentemente alcuni Autori hanno evidenziato la presenza, in un subset di melanomi tripli negativi, di mutazioni a livello del gene NF1 (neurofibromina 1), un regolatore negativo della via di segnalazione di RAS, identificandole come possibili mutazioni "driver".¹⁰⁹

Altre mutazioni potenzialmente rilevanti, oltre a quelle già elencate, in caso di melanoma *wild-type* per BRAF, NRAS e KIT, coinvolgono il gene PHIP (con mutazione che coinvolge sempre il *pathway* PI3K ed attivazione della protein-kinasi AKT), il gene CDK4, il gene ALK ed il gene ERBB4, mutazione quest'ultima riscontrata nell'11.6% dei melanomi tripli negativi.^{105,109}

Melanomi negativi per mutazioni comuni di BRAF, ed anche melanomi considerati triplo negativi, potrebbero essere portatori di mutazioni più rare, inclusa la recente scoperta di proteine di fusione di BRAF. Tali proteine di fusione consistono in un ibrido tra il dominio kinasico di BRAF e la porzione N-terminale di altre proteine, attivando la via delle MAP-kinasi.¹⁰⁹

Nella pratica clinica si procede con lo studio dello stato mutazionale di BRAF ed in caso di negatività, di NRAS, mentre la valutazione dello stato mutazionale di c-KIT è riservata ai casi di melanomi acrali e mucosali, previa valutazione dello status di BRAF ed NRAS.²⁴

Le mutazioni dei geni GNAQ/GNA11, codificanti per la sub-unità α e la sub-unità 11 di una proteina appartenente alla famiglia delle proteine G implicate nella trasduzione del segnale, sono caratteristiche del melanoma uveale, riscontrandosi nel 50% dei casi.¹¹⁰

Tali mutazioni non sembrano correlare con la prognosi del paziente.¹¹¹

PRECURSORI E CARATTERISTICHE CLINICHE

Come precedentemente esposto, il 75% dei melanomi cutanei insorge su cute priva di lesioni, mentre il 25% insorge da lesioni pre-esistenti, considerabili clinicamente precursori del melanoma. Rimane da stabilire tuttavia se tali precursori siano sempre da considerare anche biologicamente lesioni precancerose o se l'insorgenza del melanoma su una pre-esistente lesione sia interpretabile anche come un fatto statistico, dovuto alla semplice presenza di un numero elevato di melanociti. Esistono tre tipi di lesioni pigmentate considerabili precursori del melanoma: nevi melanocitici congeniti, nevi melanocitici acquisiti, e nevi displastici o atipici.¹¹²

I nevi melanocitici congeniti sono clinicamente evidenti alla nascita, o entro alcuni mesi da essa; si presentano come lesioni a margini netti che in genere mostrano una crescita dimensionale durante la fase di accrescimento del bambino, hanno superficie che col tempo può tendere a diventare rugosa, presentano spesso peli terminali nel loro contesto, e pigmentazione da marrone chiaro a scura.^{112,113}

Istologicamente, i melanociti sono disposti più in profondità rispetto ai nevi melanocitici acquisiti, spesso nei due terzi inferiori del derma e raramente anche nel grasso sottocutaneo. Possono essere isolati, disposti in aggregati regolari, o attorno a fibre collagene, attorno ad annessi, o talvolta a vasi e strutture nervose. Il rischio di evoluzione dei nevi congeniti in melanoma è assodato e strettamente dipendente dalle dimensioni. Per i nevi congeniti giganti si attesta tra il 5-10% mentre per le lesioni di minori dimensioni risulta più difficile da quantificare con precisione ma sembrerebbe essere compreso tra il 2.6% al 4.9% per i nevi di diametro inferiore ai 4.5 cm.¹¹⁴

Il melanoma su nevo congenito insorge più spesso dalla giunzione dermo-epidermica, in maniera simile a quanto riscontrabile nei nevi acquisiti; è un evento in ogni caso estremamente raro prima della pubertà, contrariamente a quanto accade nei nevi congeniti di maggiori dimensioni.¹¹²

Il nevo displastico o atipico, descritto per la prima volta nel 1978 da Clark, è caratterizzato da lesioni più spesso localizzate al tronco o agli arti, presenti in soggetti con o senza familiarità per melanoma. La diagnosi clinica di nevo displastico si basa sulle seguenti caratteristiche: diametro maggiore o uguale a 5mm, bordo irregolare con asimmetria della lesione, contorni sfumati, pigmentazione disomogenea (con variabili gradazioni dal marrone al rosso), presenza di eritema. Almeno tre dei criteri menzionati sono richiesti per poter porre diagnosi di nevo displastico, criteri in parte sovrapponibili ai criteri “ABCDE“ utilizzati per la diagnosi clinica di neoformazione melanocitaria atipica.^{6,116}

Esiste infatti un continuum tra le caratteristiche del nevo atipico e quelle del melanoma in situ, in fase di crescita radiale precoce, rappresentativo della progressione esistente da nevo atipico a melanoma.¹¹⁷

Il nevo displastico rappresenta dunque un possibile precursore del melanoma: almeno il 20% dei melanomi insorge su nevo displastico. Tuttavia tale evento è considerato piuttosto raro; si stima che 1:30.000-40.000 nevi displastici evolva in melanoma e la maggioranza di essi pertanto non si modifica o tende alla regressione.¹¹⁶

Il nevo displastico è considerabile tra i marker di aumentato rischio per l'insorgenza del melanoma, infatti individui con numerosi nevi displastici possono avere anche meccanismi di riparazione del DNA deficitari, o un incremento di feomelanina, che si è dimostrato capace di aumentare lo stress ossidativo cellulare, in parte implicato nel processo di cancerogenesi.¹¹² Queste lesioni insorgono più spesso dopo la pubertà e manifestano tendenza a rimanere relativamente dinamiche nell'età adulta, potendo anche regredire. Al contrario i nevi melanocitici acquisiti si accrescono fino ad un diametro che può raggiungere anche valori simili a quelli del nevo displastico, ma vanno successivamente incontro ad un arresto di accrescimento: la proliferazione cellulare alla giunzione dermo-epidermica si esaurisce ed i melanociti migrando nel derma vanno incontro a senescenza.^{6,117}

Come già accennato, il rischio di sviluppare un melanoma è variabile, si va da un piccolo aumento di rischio in individui con nevi displastici sporadici, senza storia familiare e/o personale di melanoma, fino ad un rischio molto elevato nel paziente con nevo atipico nell'ambito di una *Atypical Mole Syndrome* (AMS).

I nevi melanocitici acquisiti solitamente compaiono entro il primo anno di vita e possono crescere in numero e dimensione, soprattutto durante la fase di accrescimento dell'individuo, usualmente non superando i 5mm di diametro. Come già esposto, all'aumentare del numero dei nevi melanocitici, si assiste ad un aumento del rischio di melanoma: in uno studio che ha analizzato istologicamente 289 casi di melanoma cutaneo di spessore di Breslow inferiore o

uguale ad 1mm, nella metà dei casi è stata riscontrata la presenza di una componente benigna pre-esistente nel contesto della lesione riconducibile nel 56% dei casi a nevi displastici, nel 41% a nevi melanocitici acquisiti e nel 3% a nevi congeniti.¹¹⁸

Il rischio stimato per un nevo melanocitico acquisito di andare incontro a trasformazione melanomatosa entro l'ottantesimo anno di vita dell'individuo è dello 0.03% nei maschi e dello 0.009% nelle femmine.¹¹⁶

Nei nevi melanocitici acquisiti spesso albergano mutazioni genetiche molto precoci nella patogenesi del melanoma, come quella di BRAF, da sole però insufficienti a dare vita ad una completa trasformazione neoplastica.¹¹²

Caratteristiche cliniche

Il sospetto clinico di melanoma cutaneo è basato sul riconoscimento di alcune caratteristiche fenotipiche della lesione comprendenti la disomogenea distribuzione della pigmentazione, il mutamento delle caratteristiche geometriche, l'irregolarità del perimetro, associate a modificazioni nel tempo della lesione stessa. La formula "ABCDE" esemplifica queste caratteristiche:

A: asimmetria: dividendo la lesione con due linee virtuali perpendicolari in quattro quadranti, è presente una notevole asimmetria tra le parti

B: bordi: irregolari, indentati, "a carta geografica"

C: colore: disomogeneo, nero o policromo

D: dimensioni: superiori in genere a quelle di un comune nevo melanocitico acquisito, sono da valutare attentamente lesioni melanocitarie di dimensioni superiori a 5mm

E: evoluzione: la lesione mostra cambiamenti morfologici in tempi brevi, come una crescita di alcuni millimetri in pochi mesi.

Tali caratteristiche possono essere presenti tutte o solo in parte e la presenza anche solo di una di esse pone il sospetto di lesione melanocitaria con caratteri di malignità. Anche la presenza di una lesione che presenta caratteristiche morfologiche, in particolare la pigmentazione, che differiscono notevolmente da quelle dei restanti nevi melanocitici dello stesso individuo, rappresenta un indizio di lesione melanocitaria sospetta ed è indicato come segno del "brutto anatroccolo".³⁴

Altro elemento di sospetto è rappresentato dalla presenza di un nevo solitario, clinicamente atipico, in un paziente con numero molto basso di nevi o senza lesioni nevice.¹¹⁹

L'insorgenza di una lesione pigmentata in epoca avanzata, dopo il trentesimo anno di età, è un ulteriore criterio di sospetto clinico.⁴

È stata anche proposta una check-list in sette punti, la Glasgow check-list, che comprende tre criteri maggiori (1-3) e quattro minori (4-7):

- 1- cambiamento di dimensione,
- 2- cambiamento di forma,
- 3- cambiamento di colore,
- 4- diametro superiore a 5mm,
- 5- presenza di flogosi,
- 6- essudazione/sanguinamento,
- 7- prurito moderato o sensibilità alterata.

In questo caso anche la presenza di un solo criterio maggiore depone per una lesione sospetta ed i criteri minori rafforzano il livello di sospetto.¹²⁰

I melanomi, in particolare le lesioni con diametro ridotto (diversi Autori segnalano che il 2.4-10% delle lesioni hanno un diametro inferiore al criterio dimensionale dei 5mm) possono anche non mostrare alcuna caratteristica di rilevante sospetto all'ispezione clinica e rivelare la loro natura solo attraverso l'esame dermatoscopico o videodermatoscopico.^{24,121,122}

Questi atti diagnostici sono in grado di migliorare la performance nel riconoscimento precoce della neoplasia, mostrando un incremento delle diagnosi corrette almeno del 15%.¹²³

La diagnosi clinica di melanoma cutaneo è fortemente condizionata dall'esperienza, per cui la sensibilità mostra valori oscillanti tra il 50 e l'85%; è dimostrato che il dermatologo è comunque lo specialista che offre la possibilità di diagnosticare il maggior numero di lesioni in stadio precoce di malattia e quindi con prognosi migliore.^{24,119}

Diverse lesioni benigne possono mostrare caratteristiche morfologiche che le pongono in diagnosi differenziale con il melanoma cutaneo, tra cui la lentigo solare, la lentigo senile, la cheratosi seborroica, lesioni vascolari, nevi atipici o nevi melanocitici, soprattutto se a rapida crescita o intensamente pigmentati come il nevo di Spitz o di Reed, il nevo blu, il melanocarcinoma basocellulare pigmentato e la cheratosi attinica pigmentata.¹²⁴

L'ematoma sub-ungueale o l'emorragia intra-epidermica, entrano invece in diagnosi differenziale con le lesioni subungueali.³⁶

La morfologia del melanoma cutaneo è legato in parte all'istotipo ed in parte alla fase di sviluppo. È possibile distinguere clinicamente un melanoma piano, un melanoma cupoliforme, ed un melanoma piano-cupoliforme.¹²³

Il melanoma piano é quello di più frequente osservazione (80% dei casi), si presenta in genere come una lesione irregolare, spesso di diametro maggiore a 6mm, che in anamnesi risulta essersi accresciuta nei mesi precedenti in senso centrifugo (crescita orizzontale). È questa la forma di melanoma meglio descritta ed identificata dai criteri ABCDE.¹²⁰

Può essere non palpabile o palpabile: la forma palpabile risulta leggermente rilevata sul piano cutaneo, può essere inferiore al centimetro o risultare più esteso. In caso di lesione palpabile, possono accentuarsi gli aspetti precedentemente descritti, con asimmetria più marcata, maggiore irregolarità dei contorni, colore disomogeneo, aspetto finemente desquamante, talora presenza di aree erose, con squamo-croste. A volte è possibile notare aspetti regressivi, con aree bianco-grigie, o dello stesso colorito della cute sana circostante, che compaiono nel contesto della neoplasia, creando a volte aspetti anulari-arciformi. Talora, se la regressione è marcata, la lesione può non essere più apprezzabile. In questi casi la sua natura può rivelarsi anche anni dopo, con la comparsa di metastasi linfonodali o sistemiche.¹²³

Il melanoma cupoliforme è di riscontro meno frequente (18% dei casi), compare su cute sana, e tende alla crescita in altezza (fase di crescita verticale). Si presenta generalmente come papula o nodulo, di aspetto emisferico, regolare ed a superficie liscia, di colore spesso nero, bruno, bluastro; talvolta può però presentare pigmentazione distribuita in maniera irregolare, fino alla completa assenza di pigmentazione (melanoma amelanotico). In questo caso la diagnosi clinica è più difficile, può essere presente alla base una sfumatura nerastra (fenomeno della “fuga del pigmento“) di ausilio diagnostico. Il melanoma amelanotico insorge più frequentemente in pazienti anziani. La presentazione clinica più frequente è quella papulo-nodulare, esofitica, più comune in zone senza foto esposizione e senza danno attinico. Altre possibili manifestazioni sono quelle in forma di placca, oppure in forma simil-angiomatosa, a volte desquamante. Meno frequente è l'aspetto maculare, eritematoso, con alterazioni della superficie epidermica, con possibile riscontro anche in zone fotoesposte. In altri casi appare come una placca ipercheratosica, che può ricordare una verruca, altre volte ancora sotto forma di un nodulo esofitico, spesso eroso in superficie. Data l'estrema variabilità dell'aspetto clinico, il melanoma amelanotico è definito “il grande simulatore” e ad esso è associato un rischio consistente di non essere riconosciuto nelle sue fasi iniziali e pertanto di non essere asportato chirurgicamente con conseguente peggioramento della prognosi del paziente. La diagnosi differenziale con diverse lesioni melanocitarie e non, sia benigne che maligne (carcinoma a cellule di Merkel,

cheratoacantoma, emangioma, granuloma piogenico) è spesso difficile ed un aiuto importante viene dalla valutazione dermoscopica, soprattutto dall'esame del pattern vascolare. Il melanoma piano-cupoliforme è rappresentato dall'insorgenza, nel contesto di un melanoma piano (palpabile o meno), di un'area papulo-nodulare. Si tratta di un'evenienza frequente, che può presentarsi anche dopo anni dalla prima comparsa della lesione piana. È interpretabile quindi come un aspetto di progressione della neoplasia. Si ricorda inoltre che tutte le varianti cliniche di melanoma possono essere o meno circondate da lesioni satelliti, piccoli noduli bruno-nerastri o anche acromici, situati in prossimità della lesione principale, considerati un aspetto della metastatizzazione per via linfatica della neoplasia.³⁶

Tutti i nevi melanocitici, congeniti o acquisiti, dopo un periodo di lenta crescita rimangono in genere stazionari per tutta la vita ma il loro controllo deve essere comunque effettuato, se non ci sono modificazioni rapide e sostanziali (ed il soggetto non presenta particolari fattori di rischio per lo sviluppo del melanoma) con cadenza almeno biennale. La distribuzione omogenea del colore, la regolarità delle caratteristiche geometriche e le scarse variazioni temporali del nevo sono indici di benignità. È chiaramente necessaria particolare attenzione ai pazienti che presentano numerosi nevi melanocitici acquisiti di diametro superiore a 5mm o nevi clinicamente atipici. La presenza o la modificazione dei parametri ABCDE anche nel contesto di un nevo acquisito, così come la comparsa di sintomi riferibili alla lesione, come il prurito, suggerisce fortemente la necessità di una valutazione specialistica. Nel caso di un nevo congenito rappresentano elementi di sospetto anche la comparsa sul bordo di una macchia nerastra, o l'insorgenza di un nodulo acromico o pigmentato nel contesto della lesione nevica.³⁴

Va tenuto comunque in considerazione che nevi melanocitici benigni possono modificare il loro aspetto anche in relazione ad altre cause tra cui le più frequenti sono i traumi, le follicoliti, la gravidanza e l'esposizione solare.¹²³

ASPETTI ANATOMO-PATOLOGICI E FATTORI PROGNOSTICI

Classificazione istologica del melanoma cutaneo

La classificazione del melanoma cutaneo risulta basata sull'aspetto macroscopico, sede e caratteristiche istologiche delle lesioni e comprende quattro varianti principali di melanoma:

- 1) melanoma a diffusione superficiale;
- 2) melanoma nodulare;
- 3) melanoma su lentigo maligna;
- 4) melanoma acrale-lentiginoso.³⁶

Tutti gli istotipi presentano evidenza di fase di crescita orizzontale, tranne il nodulare.¹²³

Le due varianti più diffuse di melanoma sono il melanoma a diffusione superficiale e dal melanoma nodulare, che nel complesso costituiscono circa l'80% della totalità dei melanomi cutanei.¹²⁵

A questa classificazione negli anni, si sono aggiunti altri istotipi considerati più rari, classificati separatamente dall'OMS come varianti rare di melanoma, tra cui si annoverano:

- 1- Melanoma desmoplastico,
- 2- Melanoma neurotropico,
- 3- Melanoma nevoide (o melanoma a deviazione minima),
- 4- Melanoma spitzoide,
- 5- Melanoma angiotropico,
- 6- Nevo blu maligno,
- 7- Melanoma equino/di tipo animale dell'uomo (melanoma con prominente sintesi di pigmento),
- 8- Melanoma ipo/amelanotico,
- 9- Melanoma verrucoso,
- 10- Melanoma polipoide,
- 11- Melanoma su nevo,
- 12- Melanoma in regressione.^{24,126-129}

Esistono anche altre entità, non universalmente riconosciute come il melanoma metaplastico, *signet-ring*, a piccole cellule, rabdoide, melanoma a *balloon cell*. Si tratta di melanomi che presentano morfologia o antigeni più spesso riscontrati in lesioni di altra derivazione (epiteliale, osteocartilaginea o muscolare liscia). Possono presentare notevoli difficoltà diagnostiche, anche per la possibile mancanza di espressione di antigeni comunemente presenti nelle cellule di derivazione melanocitaria (proteina s100 ed HMB45); per queste caratteristiche e per la morfologia peculiare le varianti rare hanno una loro importanza, soprattutto per la difficoltà diagnostica.¹²⁷

Melanoma a diffusione superficiale - superficial spreading melanoma

Insorge in pazienti di giovane età, mediana 50 anni, rispetto a quanto rilevabile nei pazienti affetti da melanoma nodulare o melanoma su lentigo maligna, che presentano mediamente età più avanzate. Coinvolge frequentemente le sedi anatomiche interessate da esposizione solare intermittente, quali il tronco, il dorso e le estremità.^{36,120}

Generalmente si presenta come una lesione piana dal profilo irregolare, con pigmentazione variabile e lenta crescita radiale fino a che non si sviluppa invasione dermica. Quest'ultima si associa clinicamente con la presenza di un'area più rilevata rispetto al piano cutaneo. Istologicamente la componente intra-epidermica è caratterizzata dalla presenza di melanociti epitelioidi e pleomorfi, disposti in teche o singoli, con risalita intra-epidermica di tipo "pagetoide". Il melanoma a diffusione superficiale con invasione dermica è caratterizzato da una proliferazione melanocitaria asimmetrica, con distribuzione irregolare di melanociti disposti sia in teche sia in singole unità a livello intra-epidermico, negli strati sovrabasali e nel derma. Il melanoma a diffusione superficiale ha tendenzialmente prognosi migliore nei casi a crescita orizzontale, dato che l'invasione dermica è in genere minima nelle lesioni di spessore esiguo. Nella successiva fase a crescita verticale, le lesioni tendono a formare aree nodulari nel derma papillare e reticolare. In questi casi lo spessore delle lesioni è generalmente elevato, associato ad un notevole incremento dell'attività mitotica, con conseguente aumento del rischio di metastatizzazione e peggioramento della prognosi.³⁶

È possibile considerare anche una variante verrucosa del melanoma a diffusione superficiale, caratterizzato soprattutto dalla grossolana ipercheratosi e dall'iperplasia dell'epidermide; il nome deriva dal fatto che è da porre in diagnosi differenziale con una verruca virale, oltre che con neoplasie cutanee di derivazione cheratinocitaria.¹⁴

Melanoma nodulare - nodular melanoma

È caratterizzato da età d'insorgenza più avanzata rispetto al melanoma a diffusione superficiale, con una mediana di 70 anni. Può interessare qualsiasi sede corporea, ma il tronco rappresenta l'area maggiormente colpita. Nella maggioranza dei casi si presenta come un nodulo a rapida crescita dal profilo esofitico. Si tratta generalmente di tumori di maggiore spessore con conseguente prognosi severa. L'epidermide sovrastante può essere atrofica e/o ulcerata. Clinicamente il melanoma nodulare entra in diagnosi differenziale con altre neoplasie cutanee come il carcinoma basocellulare pigmentato. Per definizione istologica, le cellule melanomatose possono essere presenti nell'epidermide sovrastante ma non si estendono per più di 3 creste epidermiche oltre ai margini laterali della componente nodulare. La componente dermica è caratterizzata da teche e/o aggregati confluenti, non mostranti fenomeni di maturazione. Si possono osservare melanociti a morfologia epitelioidale, fusata, nevoide o pleomorfa, in variabile combinazione. Le cellule maligne mostrano espressioni di ipercromasia e nucleoli prominenti. Non è possibile individuare in questa forma una porzione adiacente con riconoscibile fase di crescita in situ od orizzontale. È in uso la tendenza errata ad usare impropriamente il termine "nodulare" per descrivere ogni melanoma con un nodulo visibile o componente rilevata, ma va ricordato che anche i melanomi a diffusione superficiale, la lentigo maligna/melanoma, o il melanoma lentiginoso-acrale, possono tutti sviluppare nel corso della crescita laterale aree nodulari, senza però poter essere istologicamente ascritti a tale categoria.¹²⁸

Si ritiene che la velocità di progressione del melanoma nodulare sia maggiore rispetto a quella del melanoma a diffusione superficiale. Per le caratteristiche cliniche sopra esposte, il melanoma a diffusione superficiale ed il nodulare sono da considerarsi entità biologiche distinte tra loro. Recenti studi hanno riscontrato importanti differenze di espressione genica, anche a livello di miRNA, tra i due tipi di melanoma tutto questo a supporto della grande diversità biologica.¹²⁵

Melanoma su lentigo maligna

La lentigo maligna melanoma generalmente colpisce sedi cronicamente foto-esposte, come la regione testa/collo e l'avambraccio. Spesso si presenta in pazienti di età avanzata (età mediana 80 anni) sotto forma di chiazza di ampie dimensioni, con pigmentazione disomogenea e contorni irregolari. Tale lesione può diventare rilevata sul piano cutaneo, qualora la neoplasia inizi l'invasione del derma sottostante (lentigo maligna-melanoma). Istologicamente è visibile una

proliferazione lentiginosa, non superante la membrana basale, di melanociti atipici su cute che spesso mostra danno attinico cronico (lentigo di Hutchinson).¹²⁸

L'epidermide mostra spesso elastosi solare ed è frequentemente presente assottigliamento dermico. È riscontrabile l'estensione della proliferazione melanocitaria nel contesto delle porzioni più superficiali dell'epitelio dei follicoli piliferi e nei dotti sudoripari, e la presenza di occasionali melanociti giganti multinucleati. Il termine lentigo maligna si riferisce esclusivamente alla fase iniziale, in cui la neoplasia melanocitaria mostra crescita intra-epidermica o in situ. È possibile la progressione di un lentigo solare in lentigo maligna, in tal caso si assiste ad ingrandimento, modificazione dei margini ed in genere ad un aumento della pigmentazione. Durante la sua evoluzione nel tempo, la lentigo maligna può presentare aree di regressione, spesso centrolesionali, con margini che invece continuano ad estendersi.¹²⁸

Una delle problematiche di queste lesioni è rappresentata dal fatto che i melanociti atipici possono estendersi anche a considerevoli distanze dai margini visibili della lesione, motivo per cui le recidive legate al fenomeno del "campo di cancerizzazione" risultano frequenti. Quando successivamente la crescita si estende nel derma superando la membrana basale, si è in presenza di una fase di crescita verticale e si utilizza dunque il termine di melanoma su lentigo maligna, o lentigo maligna-melanoma.¹²⁸

La componente invasiva è costituita da melanociti atipici di forma spesso fusata, disposti in aggregati e teche di dimensione variabile, commiste ad uno scarso infiltrato infiammatorio con melanofagi.³⁶

Molto raramente, è possibile lo sviluppo di un melanoma desmoplastico da una lentigo maligna. In tal caso la lesione si sviluppa come un inspessimento centrale duro e fisso, nel contesto di una macula pigmentata.¹²⁸

Melanoma lentiginoso-acrale - acral-lentiginous melanoma

Coinvolge esclusivamente le sedi acrali: regione plantare, palmare e sub ungueale. Rappresenta il 10% dei melanomi nei caucasici, ma ben il 50% dei melanomi cutanei che insorgono nelle popolazioni a fototipo di più alto grado. Rappresenta il tipo istologico di melanoma più comune in Giappone, per cui per questa entità clinico-patologica l'incidenza risulta essere molto variabile a seconda del gruppo etnico.¹²⁸

Generalmente si presenta come una chiazza pigmentata a lenta crescita con aspetto istopatologico peculiare: la lesione si manifesta inizialmente con una fase di crescita orizzontale, generalmente estesa, che può essere anche molto lenta; la fase di crescita radiale risulta simile a

quella osservabile nella lentigo maligna ed è caratterizzata da estensione considerevole, infatti in caso di escissione appaiono frequenti le recidive.¹²⁸

Durante la fase di crescita radiale è presente acantosi, con strato corneo ispessito, ed allungamento delle papille dermiche. Spesso si associa un infiltrato linfocitario a livello della giunzione dermo-epidermica. I melanociti mostrano prominenti e lunghi processi dendritici e 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.³⁴

Nelle fasi iniziali l'area a crescita verticale invasiva può però risultare molto esigua e difficile da identificare, richiedendo quindi numerose sezioni istologiche.¹²⁸ Il melanoma sub-ungueale si presenta nella maggioranza dei casi con un cambiamento di colore verso le tonalità del nero-marrone del letto ungueale, deformazione dell'unghia e positività del segno di Hutchinson, rappresentato dall'invasione clinicamente visibile della zona periungueale.¹³⁰

Melanoma desmoplastico

Rappresenta l'1% di tutti i melanomi ed è considerato il più comune istotipo tra le forme rare.¹²⁹ Si compone di cellule fusate, fibroblasto-simili, con scarso citoplasma e nucleo ipercromatico, non pigmentate, con variabile atipia citologica, disposte tra le fibre collagene dermiche ed immerse in abbondante stroma fibroso. Talora le cellule neoplastiche si dispongono in pattern storiforme. Spesso si osserva infiltrato infiammatorio nel contesto e/o alla periferia del tumore, e marcata elastosi solare. Si osserva neurotropismo in circa il 30% dei casi, che vengono pertanto classificati come melanomi desmoplastici-neurotropi; la diffusione tumorale lungo i tronchi nervosi cutanei è comune, soprattutto quando è interessata l'area della testa e del collo, e può essere associata a dolore severo.¹²⁸

Fattori prognostici

La sopravvivenza dei pazienti affetti da melanoma cutaneo dipende principalmente dallo stadio al momento della diagnosi. I fattori prognostici istologici rappresentano al momento i principali indicatori di prognosi consolidati, anche se markers molecolari sono in fase di studio. L'attuale sistema di classificazione del melanoma cutaneo permette di predire con una certa accuratezza la storia clinica, anche nei casi diagnosticati in fase precoce di malattia. Purtroppo circa il 5% dei

pazienti affetti da melanoma con spessore ≤ 1 mm, solitamente a prognosi favorevole, possono andare incontro a processi di ricaduta locale e metastatizzazione.³⁶

Questo dato sottolinea la necessita clinica di poter disporre di indicatori molecolari in grado di caratterizzare ulteriormente la genetica della lesione melanomatosa e stratificare il rischio di progressione con maggiore precisione. Identificare sottogruppi di pazienti a rischio di progressione al momento della diagnosi iniziale consentirebbe una più corretta pianificazione terapeutica già in partenza, l'accesso a specifiche terapie ed un possibile miglioramento della sopravvivenza.³⁶

I fattori prognostici del melanoma cutaneo non sono dunque rappresentati solo da fattori istologici ma anche dalle caratteristiche cliniche del paziente e dallo status genetico della neoplasia.¹³¹

Fattori prognostici istologici

Il sottotipo istologico, per quanto importante nel momento diagnostico, non è oggi considerato tra i fattori prognostici, contrariamente a quanto si riteneva in passato.²⁴

Recenti studi, compresa la recente rivalutazione dei fattori prognostici eseguita dalla Melanoma Taskforce della AJCC, hanno definitivamente dimostrato infatti che la classificazione istologica del melanoma cutaneo non rappresenta un prognostico indipendente. Inoltre le principali raccomandazioni per la gestione clinica delle lesioni primarie e del trattamento della malattia metastatica non tengono in considerazione l'istotipo di melanoma.¹¹⁰

Unica eccezione è rappresentata dal melanoma desmoplastico, poiché possiede un comportamento biologico assimilabile a quello di un sarcoma, con frequente disseminazione per via ematogena e precoce coinvolgimento polmonare, anziché diffusione linfatica. In questa forma, a causa della maggiore tendenza a sviluppare recidiva locale i pazienti sono, presso numerosi centri, sottoposti anche a radioterapia post-operatoria. L'informazione riguardante l'istotipo quindi, insieme ai dati clinici, assume in alcuni casi un peso validità nella gestione del paziente, specialmente se la neoplasia interessa sedi anatomiche critiche per estetica e/o funzione.^{36,132}

Fase di crescita

La fase di crescita, radiale o verticale, del melanoma rappresenta uno tra i principali fattori condizionanti la prognosi della malattia. Il melanoma progredisce idealmente attraverso tre steps

principali: fase di crescita radiale in situ, fase di crescita radiale invasiva, fase di crescita verticale, seguita da metastatizzazione, secondo un modello sequenziale di progressione.^{36,133}

Questi vari steps sono identificabili all'esame istologico, e predittivi di un differente potenziale metastatico. La fase radiale è considerata "non tumorigenica", caratterizzata cioè dalla proliferazione di melanociti neoplastici nell'epidermide e/o nel derma papillare, singoli o a piccoli nidi, ma senza formazione di un nodulo tumorale; per definizione tutti i melanomi in situ possiedono fase di crescita radiale. Quando il melanoma invade il derma, potrebbe ancora avere solo fase di crescita radiale, a singole cellule, o a piccoli nidi senza figure mitotiche.¹³²

La fase di crescita verticale rappresenta la fase "tumorigenica", nella quale il melanoma acquisisce maggiore capacità di metastatizzare, ed è caratterizzata morfologicamente dalla presenza di noduli espansivi, di dimensioni maggiori rispetto agli aggregati intraepidermici e/o dalla presenza di figure mitotiche nella componente invasiva.^{24,132}

Indipendentemente dallo spessore di Breslow, che può essere anche identico, un melanoma in fase di crescita verticale ha comunque un maggior potenziale metastatico rispetto ad un melanoma in fase radiale a causa del maggior volume di cellule neoplastiche.¹³²

Si ritiene dunque che i melanomi con spessore inferiore ad 1mm, in fase di crescita radiale, comportino una sopravvivenza vicina al 100%. Per quanto riguarda la fase di crescita verticale, secondo alcuni autori il fenotipo cellulare mostrato dalla componente con tale fase di crescita (ad esempio cellule epitelioidi, fusiformi), potrebbe avere un valore prognostico.¹³⁴

Spessore di Breslow

Lo spessore di Breslow rappresenta uno dei fattori prognostici che maggiormente correla con la prognosi di malattia. È considerato ad oggi il fattore prognostico indipendente più importante per la sopravvivenza del paziente e possiede grande peso nel predire la metastatizzazione linfonodale.¹³⁴

Viene misurato a partire dallo strato granuloso o, quando la lesione è ulcerata, dal fondo dell'ulcerazione fino al punto di massima infiltrazione della neoplasia in profondità.²⁴

È importante ricordare che il coinvolgimento di follicoli e strutture annessiali da parte di un melanoma in situ, anche se si tratta di elementi situati in profondità, non va considerato per la misurazione dello spessore di Breslow, al contrario dell'invasione perineurale.¹³²

Certamente un maggiore spessore di Breslow è indicativo di una maggiore probabilità di presentare crescita verticale, di un maggior volume tumorale e correla in genere con una maggiore progressione biologica della neoplasia.¹³⁵

Melanomi di 0,76 mm di spessore di Breslow, correlano con una sopravvivenza del 99% a 5anni, con dato a 10 anni del 92%. Pazienti con melanomi di 1mm di spessore di Breslow, hanno un 20% di mortalità a 10 anni mentre tumori superiori a 4 mm presentano una mortalità del 50% a 10anni.¹³⁴

Livello di invasione di Clark

Il livello di invasione di Clark ha dimostrato di possedere un valore aggiunto da un punto di vista prognostico, soprattutto nei melanomi con spessore di Breslow < 1mm. 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.³⁶

Per i melanomi <1 mm, viene riportato un rischio di progressione di malattia 3,5 volte maggiore per il livello III di Clark, rispetto al livello II.¹³⁴

Per “*microstaging*“ del melanoma cutaneo si intende la misurazione, all’esame istologico dell’intera lesione, dello spessore verticale della neoplasia in millimetri o identificando il livello anatomico dell’invasione (livello di Clark).

Ulcerazione

L’ulcerazione è riconosciuta come una significativa variabile prognostica e tende a predire una maggiore probabilità di metastatizzazione a livello viscerale-osseo. L’ulcerazione viene valutata microscopicamente in base alla presenza delle seguenti caratteristiche:

- a) mancanza dell’epidermide a tutto spessore compreso lo strato corneo,
- b) evidenza di fenomeni reattivi (depositi di fibrina, neutrofil),
- c) iperplasia reattiva o assottigliamento dell’epidermide adiacente, in assenza di trauma in anamnesi.¹³⁴

La correlazione con la prognosi probabilmente è dovuta ad una più rapida crescita tumorale, l’ulcerazione ragionevolmente si verifica per ischemia relativa della massa tumorale, dovuta proprio alla rapida crescita. La sopravvivenza a 5anni per gli stadi I/II, passa dall’80% al 55% in presenza di ulcerazione, per lo stadio III dal 53% al 12%. Risulta utile sottolineare come la maggioranza delle neoplasie in stadio IV si presenta già ulcerata al momento della diagnosi.

L'ulcerazione è quindi un parametro prognostico molto importante tanto da essere incluso anche nella stadiazione TNM.¹³⁴

Indice mitotico

Anche l'indice mitotico rappresenta un importante fattore prognostico. Il numero di mitosi/mm² è stato introdotto come variabile utile per la stadiazione nell'ultima revisione del sistema TNM AJCC. La prognosi dei melanomi considerati ad apparente basso rischio (< 0,76 mm di spessore) risulta fortemente influenzata dal numero di mitosi. È sufficiente che vi sia una mitosi/mm² per decidere infatti in favore della metodica del linfonodo sentinella.²⁴

L'indice mitotico sembra correlare in parte con lo spessore del melanoma, ma in analisi multivariata rimane comunque un fattore prognostico indipendente, al contrario di quanto accade per il tipo istologico di melanoma. I risultati di alcuni studi identificano l'indice mitotico come il secondo fattore prognostico più importante dopo lo spessore. Il riscontro all'esame istologico di una figura mitotica comporta una riduzione della sopravvivenza, che peggiora all'aumentare del numero di mitosi, anche se in maniera non lineare.¹³⁴

L'indice mitotico deve essere espresso come numero di mitosi/mm² ed è valutato nella componente invasiva del melanoma, a partire dalle zone con maggiore attività mitotica, definite "hot spot", estendendo la conta ai campi adiacenti per un'area complessiva di 1 mm². Se non sono identificabili "hot spots" e le mitosi sono diffuse nella componente in fase di crescita verticale, si sceglie un campo con numero di mitosi rappresentativo e si estende la conta ai campi adiacenti, sempre per un'area complessiva di 1 millimetro quadrato.²⁴

Infiltrato infiammatorio

Anche la presenza di una reazione infiammatoria nei confronti della neoplasia rappresenta un fattore prognostico. In alcuni studi la presenza di linfociti infiltranti il melanoma è risultata essere un fattore prognostico indipendente associato a prognosi favorevole, in altri invece ha perso valore di fronte all'analisi multivariata. La presenza di linfociti infiltranti la neoplasia viene classificata secondo i criteri di Elder et al. stabilendo l'estensione e la localizzazione dell'infiltrato linfocitario nella componente invasiva dermica del melanoma.¹³⁶ L'infiltrato infiammatorio viene classificato in "brisk, non brisk e assente".¹³⁷ L'infiltrato Brisk, che si ritiene correlato a prognosi positiva, si spinge all'interno della neoplasia estendendosi anche a tutta la base del melanoma. Il non-Brisk è rappresentato da uno o più foci di infiltrato linfocitario

all'interno o alla periferia del tumore. L'infiltrato viene invece considerato assente se non sono presenti linfociti. Alcuni autori considerano la presenza di plasmacellule e macrofagi come un fattore potenzialmente negativo.¹³⁸ È inoltre emerso che l'infiltrato definito come "absent", correla più spesso con la positività del linfonodo sentinella, mentre l'infiltrato Brisk mostra percentuali minori percentuali di positività linfonodale.¹³⁹

Pertanto, la determinazione dei TILs (Tumor Infiltrating Lymphocytes) secondo la classificazione di Elder et al., nel referto anatomopatologico, è attualmente consigliata. Altri studi recenti confermano il dato e rilevano una sopravvivenza migliore nei pazienti con infiltrato linfocitario marcato.¹⁴⁰

Regressione

Sembra esistere una relazione tra il fenomeno della regressione e la prognosi di malattia, anche se questo parametro non è da tutti considerato un fattore prognostico indipendente. I risultati all'analisi multivariata indicano che, almeno nei melanomi a crescita radiale, il valore prognostico della regressione risulta mantenuto.²⁴

La regressione implica una risposta immunologica dell'ospite contro il tumore, interpretabile potenzialmente come un fattore positivo; è però possibile che la presenza di estesi fenomeni di regressione possa determinare una sottostadiazione del tumore primitivo. Secondo altri Autori la regressione potrebbe dare luogo a selezione dei cloni neoplastici più aggressivi, senza riuscire a fermare completamente la progressione neoplastica.¹⁴¹

La regressione viene evidenziata dalla presenza al preparato istologico di fibrosi dermica, talvolta con proliferazione vascolare, infiltrato infiammatorio e presenza di melanofagi, con completa o parziale distruzione delle cellule maligne. Può essere presente un assottigliamento dello strato epidermico sovrastante, con perdita del classico profilo delle papille dermiche. La portata del fenomeno regressivo può essere molto variabile, andando da focale ad esteso, si considera estesa la regressione che coinvolge più del 50% della componente invasiva della neoplasia.¹³²

Nel referto anatomico-patologico la presenza di regressione dovrebbe sempre essere riportata e quantificata tramite misurazione. Quando estesi fenomeni di regressione sono associati ad una residua componente di melanoma intraepidermico, il referto dovrebbe specificarlo, evitando ad esempio di classificarlo semplicemente come "melanoma in situ con fenomeni di regressione", espressione che potrebbe portare invece a sottostimare il potenziale biologico della lesione.²⁴

Sulla scorta di questi dati, presso alcuni centri, se è presente regressione estesa si considera il ricorso alla metodica del linfonodo sentinella anche in melanomi cutanei di spessore <1mm.¹³²

È infatti stata riscontrata in questo particolare sottogruppo di pazienti una aumentata percentuale di metastasi, sia linfonodali che sistemiche.¹⁴²

Si stima che la regressione sia presente nel 58% dei melanomi con Breslow inferiore o uguale a 0,75 mm e la presenza di regressione in generale risulti presente nel 10-35% dei melanomi.¹⁴¹⁻¹⁴³

Uno recente studio ha identificato come nel paziente con melanoma sottile (Breslow \leq 1mm) la regressione marcata sia un importante fattore prognostico indipendente.¹⁴⁴

Infiltrazione linfovaskolare e microsatellitosi

La prognosi dei pazienti con microsatellitosi non risulta ad oggi essere diversa rispetto a quella dei pazienti con macrosatellitosi. Per microsatellitosi si intendono aggregati cellulari di diametro maggiore o uguale a 0,05mm, distanziati dal tumore principale da tessuto normale non interessato da infiammazione o fibrosi. I macrosatelliti sono invece lesioni metastatiche cutanee poste entro 5cm dal melanoma primitivo o entro 2 cm dalla cicatrice chirurgica.¹³²

Non appare esserci differenza prognostica nemmeno tra presenza di satellitosi e presenza di metastasi in transit, cioè metastasi, spesso multifocali, situate a più di 5 cm dalla lesione primitiva, che si diffondono attraverso il sistema linfatico localizzandosi tra la sede della lesione primitiva e la stazione linfatica regionale drenante.³⁶

Nella stadiazione TNM la presenza sia di microsatellitosi, che di satellitosi o metastasi in transit, determina un incremento di stadio della malattia. L'invasione linfovaskolare sembra rappresentare un ulteriore fattore prognostico negativo. Sia l'identificazione della presenza di microsatelliti che l'invasione linfovaskolare determinano un impatto considerevole sulla prognosi, comportando un incremento del rischio di ricaduta a livello cutaneo (metastasi in transit) ed anche di interessamento linfonodale.²²

La microsatellitosi comporta un incremento del rischio di positività linfonodale, con rischio che passa dal 12% al 53%, nei pazienti con melanoma di spessore di Breslow >1,5mm.¹³²

Una recente metanalisi di Pastushenko et al. conferma il valore prognostico dell'invasione linfatica ed aggiunge anche la densità dei vasi linfatici peri-tumorali tra i fattori prognostici del melanoma cutaneo.¹⁴⁵

L'invasione vascolare comporta una riduzione di sopravvivenza: se riscontrata nel tumore primitivo in fase di crescita verticale secondo alcune analisi multivariate sembrerebbe avere un valore prognostico simile a quello dell'ulcerazione.¹³⁴

L'invasione linfovaskolare sembra essere un fattore prognostico indipendente anche nei melanomi sottili.¹⁴⁴

Status linfonodale (N) e presenza di metastasi a distanza (M)

La diffusione ai linfonodi, nel melanoma cutaneo rappresenta fenomeno frequente e la presenza di malattia nelle stazioni linfonodali assume un significato prognostico negativo. Quantificando l'interessamento linfonodale sia in termini di numero di linfonodi coinvolti, sia in termini di interessamento micro-metastatico o macrometastatico, e stratificando il dato si ottengono sopravvivenze diverse. Ad esempio in caso di micrometastasi linfonodali la sopravvivenza a 10 anni è del 63% e scende al 47% in caso di macrometastasi. Con l'incremento del numero di linfonodi coinvolti (da 1 a 3) si palesa un ulteriore abbassamento della sopravvivenza a 5 anni.¹³¹ Chiaramente in caso di metastasi sistemiche la prognosi peggiora, con ulteriore peggioramento per ogni altro organo coinvolto.¹³¹

Secondo la definizione AJCC, le metastasi linfonodali riscontrate all'esame istologico del linfonodo sentinella o alla dissezione linfonodale, sono considerate micro-metastasi; le metastasi linfonodali riscontrate clinicamente o tramite imaging, sono considerabili macrometastasi. La definizione non si riferisce direttamente al diametro delle lesioni, ma alla modalità di identificazione.¹⁴⁶

Si definiscono sub-micrometastasi metastasi linfonodali di diametro <0,1mm. Questi pazienti sembrano essere a rischio molto basso di progressione, specie se la localizzazione sub-micrometastatica è sita a livello linfonodale nello spazio sottocapsulare.³⁶

Fattori prognostici non istologici

- Sito anatomico: il sito anatomico del melanoma primario ricopre un importante valore prognostico; melanomi cutanei delle zone centrali (tronco, testa e collo) tendono ad avere prognosi peggiore, rispetto a quelli che originano ad esempio dagli arti.¹³¹
- Sesso: le donne mostrano una prognosi migliore, ma il valore di questo fattore è stato recentemente messo in discussione per la maggior tendenza a presentare una maggiore tendenza a sviluppare melanomi sottili dell'arto inferiore, di per se associati a miglior prognosi.¹³¹⁻¹³⁴ Ad ogni modo, uno studio condotto su 10.538 donne olandesi, che ha considerato la localizzazione anatomica, lo spessore di Breslow, l'istotipo, l'età, lo stato

linfonodale e sistemico, ha confermato che il sesso è un fattore prognostico indipendente, anche se i fattori prima riportati ricoprono un certo peso.¹⁴⁷

- Età: nei pazienti di età superiore a 60 anni si riscontra usualmente una prognosi peggiore.¹³¹⁻¹³⁴

Risultati di un recente studio che ha coinvolto decine di migliaia di pazienti dal database AJCC, hanno confermato che l'età è un fattore prognostico indipendente e che i melanomi che insorgono alle età estreme (< 20 anni o > 70 anni) sembrano avere anche caratteristiche biologiche differenti. Sotto i 20 anni di età sono comuni caratteristiche istologiche di una certa aggressività, con una maggiore frequenza di alcuni istotipi su altri ed una maggiore tendenza a sviluppare metastasi linfonodali, ma la sopravvivenza dei pazienti risulta migliore. In età avanzata, c'è una maggiore prevalenza di lesioni della testa e del collo, con un numero maggiore di melanomi di tipo desmoplastico o acrali-lentiginosi ed una diminuzione delle lesioni al tronco. Parimenti lo spessore di Breslow e la conta mitotica tendono ad aumentare ed in generale si assiste ad un peggioramento globale di tutti i fattori prognostici istologici e della prognosi. Anche il profilo molecolare dei melanomi varia al mutare dell'età: nei bambini si assiste più spesso alla perdita di INK4A e a mutazioni di KIT, mentre nei giovani sono più comuni melanomi BRAF mutati. Questo dato, assieme all'evidenza di un diverso status immunologico, potrebbe spiegare la differenza di prognosi età-correlata, pur essendo difficile a volte escludere che le comorbidità dei pazienti più anziani non contribuiscano, almeno in parte, alla loro peggiore prognosi.

- Livelli di LDH sierico: L'LDH sierico è da tempo riconosciuto come fattore prognostico indipendente nel melanoma cutaneo. Nel paziente con metastasi sistemiche, livelli elevati sono predittivi di sopravvivenza ridotta del 50%, rispetto ai pazienti con LDH normale.¹³¹ Si tratta comunque di un marker sierologico piuttosto aspecifico, ed anche se risulta incluso nella stadiazione TNM del melanoma spesso risulta poco utile nella pratica clinica.¹⁴⁹

Alcuni studi indicano che solo il 38% dei pazienti con melanoma metastatico ha LDH elevato ed il suo innalzamento sembra essere un evento molto tardivo nella storia naturale della malattia, pertanto non è risultato essere un fattore prognostico indipendente in tutti gli studi.¹⁵⁰

- Livelli sierici di proteina S100: Questa misurazione risulta utile soprattutto nei pazienti con malattia ad estensione loco-regionale operata, il suo incremento correla infatti con alto rischio di ripresa di malattia e mortalità.¹³¹

Si tratta comunque di un marker utile in fase avanzata mentre in caso di malattia ancora localizzata (stadio I-II) non sembra rilevarsi di alcuna utilità.¹⁵¹

- Livelli sierici di proteina C reattiva (PCR): Elevati livelli di PCR sono stati correlati a cattiva prognosi in numerose neoplasie. Nel melanoma il loro valore come marker di cattiva prognosi risulterebbe più affidabile nel paziente metastatico, rispetto al valore dell'LDH, con un cut-off di 3mg/L, come considerato da alcuni studi. Si tratta però di un marker della risposta di fase acuta del processo infiammatorio e mostra quindi sensibilità e specificità non ottimali.¹⁵⁰
- Status genetico: è stato dimostrato come nei pazienti con malattia diffusa ai linfonodi regionali la positività per la mutazione BRAF rappresenti un fattore prognostico negativo.^{131,152} I pazienti con mutazioni in BRAF ed NRAS metastatici risultano avere una maggior probabilità, rispetto agli *wild-type*, di avere metastatizzazione al sistema nervoso centrale e lo status mutazionale positivo per NRAS correla con una minor sopravvivenza nel paziente metastatico.¹⁵³

È stato recentemente elaborato dalla Task force melanoma presso l'AJCC un modello matematico (Individualized Melanoma Patient Outcome Prediction Tool), periodicamente aggiornato, per permettere una stima della prognosi del paziente che tenga conto di tutti i sovraccitati elementi. Il modello predittivo è accessibile in rete (www.melanomaprognosis.org).¹⁴⁸

Grazie alla sempre più completa conoscenza della patogenesi del melanoma molte molecole di recente scoperta, implicate nei processi di invasione e metastatizzazione, stanno mostrando un certo grado di correlazione con la prognosi. Alcune di esse presentano anche rilevanza in altre neoplasie, suggerendo una certa similitudine in alcuni processi biologici fondamentali.

- Galectina-3: La galectina-3 è una molecola che sembra correlare a cattiva prognosi nel carcinoma epatocellulare, con una maggiore vascolarizzazione della lesione neoplastica primitiva.¹⁵⁴ Si tratta di una proteina multifunzionale, che fa parte della famiglia delle lectine leganti il α -galattoside, risulta implicata nella differenziazione cellulare, nella proliferazione, nella neo-angiogenesi, nell'invasione tumorale e nel processo di metastatizzazione.^{150,154,155}

Nel melanoma è stata identificata come fattore prognostico indipendente nel 2009 ed è risultata un utile fattore nel predire la sopravvivenza dei pazienti con tumori avanzati

(stadio III/IV) con un cut-off dei livelli sierici di 10ng/ml dove livelli superiori risultavano correlati a cattiva prognosi.^{150,154}

Nel paziente con melanoma la galectina-3 risulta incrementata nel siero sia perché prodotta dalle cellule neoplastiche sia perché prodotta dalle cellule infiammatorie.¹⁵¹

Recenti studi sembrano confermare l'importante ruolo nella fase metastatica di questa molecola, la cui presenza nel melanoma primitivo (rilevabile nel preparato istologico) sembra essere utilizzabile per predire la prognosi del paziente, ma si attendono ulteriori dati su casistiche più estese per confermare tale dato.¹⁵⁶

- Microarray: Raskin et al. indagando i microarray di melanomi cutanei primitivi evidenziano, in un recente lavoro, il loro ruolo come nuovi potenziali fattori prognostici, la cui espressione correla negativamente con la sopravvivenza libera da metastasi e con la sopravvivenza del paziente.¹⁵⁷
- miRNA: La ricerca di nuovi fattori prognostici per il melanoma cutaneo ha coinvolto anche i miRNA, certamente implicati nella patogenesi del melanoma, ma utilizzabili anche come markers, ad esempio in caso di pazienti trattati chirurgicamente. Il miRNA-21 sembra essere correlato allo spessore di Breslow ed alla presenza di ulcerazione nel melanoma primitivo. Risulta dosabile tramite prelievo ematico ed i suoi livelli si abbassano prontamente, scomparendo, nei prelievi effettuati dopo intervento chirurgico. Sulla scorta di ciò viene oggi indicato come possibile marker nel follow-up, anche se sono necessari ulteriori studi su più ampie casistiche per confermare i dati preliminari. Rappresenta dunque un promettente fattore prognostico per il paziente avanzato ed attualmente la ricerca si sta focalizzando sulla caratterizzazione dei profili di espressione contemporanea di multipli miRNA.¹⁵⁸

Ulteriori studi hanno correlato la prognosi del paziente con la presenza di molecole rilevabili a livello istologico nel tumore primitivo come EIF5A2 (Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A-2), Phip (Pleckstrin Homology domain Interacting Protein), entrambi interagenti a diversi livelli con la via della PI3K, ed altri markers di attività immunosoppressiva rilevabili nei TILs del tumore primitivo.¹⁵⁹⁻¹⁶¹

Questi interessanti risultati richiederebbero ulteriori studi su più ampie casistiche, volti a chiarire la loro applicabilità nel contesto clinico.

DIAGNOSI

Nella pratica clinica le lesioni cutanee considerate sospette devono essere esaminate in presenza di adeguata illuminazione e mediante l'ausilio della dermoscopia. Ad oggi il gold standard per escludere verificare la natura di una lesione considerata sospetta è l'esame anatomo-patologico della biopsia escissionale. Per decidere quali lesioni sottoporre a tale operazione vengono analizzati diversi aspetti morfologici raccolti e ordinati diverse in check-list, cliniche e dermatoscopiche, tra cui si annovera l'ABCDE.¹⁶²

Tale metodica mostra una sensibilità che varia dal 57 al 90% ed una specificità dal 59 al 90%, con una buona concordanza tra diversi osservatori.^{24,162}

Negli ultimi 30 anni si è assistito ad un aumento del numero delle diagnosi precoci, passando da un sospetto diagnostico posto esclusivamente sulle caratteristiche cliniche macroscopiche all'uso integrato di strumenti diagnostici. È stato parallelamente dimostrato che i pazienti correttamente istruiti sul valore dell'auto-ispezione cutanea (*skin self-examination*) presentano mediamente lesioni meno avanzate con conseguente prognosi migliore.¹⁶² L'ispezione dell'ambito cutaneo, condotta da personale medico qualificato nell'identificazione delle neoplasie cutanee, ha valori di sensibilità che variano dal 89% al 97% e le lesioni diagnosticate in seguito a screening periodico da parte di dermatologi mostrano spessori di Breslow inferiori del 50% rispetto alla media.¹⁶² Infatti negli ultimi anni è stato riscontrato un aumento del numero delle lesioni diagnosticate nello stadio iniziale "in situ" con sensibile miglioramento della prognosi.¹⁶³

L'avvento della dermoscopia ha radicalmente modificato l'approccio diagnostico del dermatologo, consentendo innanzitutto di identificare le lesioni melanocitarie e poi di confermare l'eventuale sospetto di malignità all'osservazione clinica, riducendo il numero di escissioni non necessarie.^{162,164}

Mediante l'utilizzo di questa metodica, di facile impiego clinico, la diagnosi clinica raggiunge sensibilità e specificità del 90%, con valori ancora più alti se nelle mani di un dermatologo con almeno 5 anni di esperienza.^{36,162}

La dermoscopia rappresenta una tecnica in vivo, non invasiva, che permette di valutare a maggiore ingrandimento la neoformazione, consentendo una migliore caratterizzazione di elementi contenuti nello spessore dell'epidermide e del derma papillare, altrimenti non apprezzabili ad occhio nudo. L'architettura della lesione appare più nitida ed è possibile analizzare il pattern della vascolarizzazione e della distribuzione del pigmento. Questa tecnica consente una migliore interpretazione diagnostica delle lesioni melanomatose sottili, dei nevi

melanocitici e delle lesioni non melanocitarie agevolando la diagnosi differenziale dei carcinomi cutanei, cheratosi seborroiche, dermatofibromi, angiomi ed angiocheratomi.³⁶

Il primo orientamento nel corso dell'esame dermoscopico è legato alla valutazione del colore, del grado di pigmentazione e della sua relativa distribuzione nell'ambito della lesione. La melanina rappresenta il pigmento più importante nel determinare differenti pattern strutturali e cromatici. A seconda della localizzazione del pigmento melanico nei vari strati cutanei la lesione assume una colorazione differente: nero per pigmento presente nello strato corneo-spinoso, marrone con varie gradazioni in rapporto alla quantità di pigmento presente per localizzazione giunzionale, blu con varie gradazioni a partire dal derma papillare, fino al reticolare. Altri colori visualizzati durante l'esame dermoscopico sono le tonalità del bianco, indicative di regressione, e del rosso, correlate alla vascolarizzazione. Nei nevi melanocitici il pigmento appare omogeneo, a limiti sfumati e più addensato al centro della lesione. Nel melanoma, e talora anche nei nevi in regressione, le aree di pigmentazione sono più disomogenee, asimmetriche, irregolari, localizzate a volte alla periferia della lesione con la presenza di numerose tonalità di colore (più di tre colori). La marcata disomogeneità e le interruzioni improvvisate del disegno pigmentario in periferia possono rappresentare un criterio importante per la diagnosi di melanoma. In aggiunta, possono essere messe in evidenza anche caratteristiche microstrutturali e vascolari, che possiedono numerose modalità di presentazione.³⁴ A causa dell'elevato numero di caratteristiche da prendere in considerazione, la diagnosi in dermatoscopia si avvale di algoritmi tra cui la pattern analysis, l'ABCD di Stolz, il metodo di Menzies e la Seven-point check list risultano essere fondamentali.^{36,162}

Il dermatoscopio manuale rimane lo strumento in assoluto più diffuso ma l'esame dermoscopico può essere effettuato con altri strumenti come lo stereomicroscopio o il videodermatoscopio. Lo stereomicroscopio è uno strumento ottico binoculare che consente una visione tridimensionale della lesione, con possibilità di maggiori ingrandimenti rispetto al dermatoscopio manuale (da 6x a 40x) e possibilità di variare l'intensità luminosa. Può essere collegato ad una telecamera ad alta risoluzione o ad un computer, garantendo così la possibilità di acquisire immagini utilizzabili durante il follow-up. Il videodermatoscopio è invece costituito da una sonda, al cui interno è posta una telecamera ad alta risoluzione, collegata ad un computer con possibilità di memorizzare le immagini ed utilizzarle nel follow-up.¹⁶⁵

La videodermatoscopia risulta particolarmente utile nei pazienti presentanti un elevato numero di lesioni melanocitarie e in quelli affetti dalla sindrome del nevo displastico. In questi casi la semplice dermatoscopia manuale risulta insufficiente, la mappatura dell'intera superficie corporea, con follow-up delle lesioni sospette risulta invece essere di grande aiuto.^{162,164,165}

Le metodiche di foto-documentazione hanno visto continui miglioramenti tecnici ed oggi sono disponibili sistemi di fotografia dell'intera superficie corporea. Queste apparecchiature consentono una maggiore capacità di obiettivare l'evoluzione delle lesioni già presenti e l'eventuale insorgenza di una nuova lesione, mediante fotografia del paziente alla prima visita ed a tutte le successive.^{34,165}

Risultano oggi applicabili altre tecniche diagnostiche tra cui si annoverano il microscopio confocale a scansione laser, la tomografia a coerenza ottica, l'ecografia ad alta risoluzione e la bioimpedenza.¹⁶²

Il microscopio confocale a scansione laser è uno strumento che fornisce immagini in vivo, in maniera non invasiva ed in tempo reale della lesione, dando una rappresentazione per piani paralleli orizzontali, situati a variabile profondità, con risoluzione equivalente a quella della microscopia classica. Questo consente di avere immagini delle singole cellule, dettagli dell'architettura dell'epidermide e del derma, con criteri interpretativi molto simili a quelli istologici, senza il bisogno di effettuare la biopsia escissionale cutanea. Il vantaggio di questa tecnica risiede in una più alta sensibilità rispetto alla dermoscopia convenzionale ma con specificità simile. La tomografia a coerenza ottica (OCT) è una tecnica non invasiva che sfrutta, per costruire l'immagine, la diversa riflessione della luce da parte di strutture differenti come melanina e membrane cellulari. Questa metodica risulta in grado di analizzare l'architettura delle lesioni e dei tessuti fino ad 1mm di profondità, senza poter dare però informazioni sulla morfologia cellulare. La metodica non è ancora stata applicata a casistiche sufficientemente ampie in modo da ottenere dati sulla sua sensibilità e specificità, in modo da chiarire il suo possibile ruolo nei percorsi diagnostici.¹⁶⁶

L'ecografia ad alta risoluzione è una tecnica non invasiva che sfrutta ultrasuoni ad alta frequenza, consentendo una migliore risoluzione in lesioni di piccole dimensioni e superficiali. L'ecografia può essere utilizzata principalmente per chiarire la profondità e lo spessore del melanoma o per la diagnosi differenziale, con alta sensibilità e buona specificità, tra carcinoma basocellulare e melanoma. Grazie alla sua precisa caratterizzazione dello spessore del melanoma può essere d'aiuto in fase pre-operatoria. Come nell'ecografia tradizionale si può associare l'utilizzo del doppler ed anche del mezzo di contrasto ecografico, in modo da cercare di caratterizzare la vascolarizzazione del tumore, fattore che può correlare con la sua aggressività.¹⁶⁷

La bioimpedenza è la misurazione della resistenza al passaggio di corrente. I valori di bioimpedenza variano dalle lesioni benigne, alle maligne, alla cute normale circostante, in funzione della forma delle cellule, della diversa composizione tra le varie membrane cellulari e

del contenuto di acqua. Le cellule di melanoma risultano infatti possedere diversa forma, orientamento e dimensione, rispetto alle cellule benigne, per cui possono essere facilmente distinte. La misurazione della bioimpedenza viene effettuata tramite elettrodi posti sia nel centro della lesione, che in una zona di cute normale di riferimento, a cinque livelli di profondità differenti, approssimativamente a partire da 0,1 mm, fino a 2 mm. I dati sono successivamente elaborati da un computer. Le proprietà di bioimpedenza sono purtroppo influenzate anche da età, sesso, stagione e sito anatomico, per cui la tecnica richiede ulteriori studi per poter dare esiti più standardizzabili.¹⁶²

ESCISSIONE DELLA LESIONE PRIMITIVA

In presenza di una lesione cutanea con sospetto clinico di melanoma risulta indicata la biopsia escissionale. Si raccomanda in caso di sospetto melanoma di evitare biopsie incisionali, con scarificazione o *shaving*, per la possibilità di disseminazione metastatica a seguito del trauma chirurgico. Si procede invece all'asportazione completa della lesione, in genere con una procedura semplice, attuabile in anestesia locale ed in regime ambulatoriale, lasciando almeno 2mm di margine di tessuto sano circostante. L'asportazione deve comprendere il grasso sottocutaneo fino alla fascia muscolare sottostante.¹⁶⁸

La scelta delle linee di incisione dell'escissione primaria deve tener conto della possibilità di un successivo intervento di allargamento. Effettuare in prima battuta una biopsia escissionale con margini più ampi di quelli raccomandati potrebbe compromettere lo studio del drenaggio linfatico mediante tecnica del linfonodo sentinella.¹⁶⁹

La biopsia escissionale permette di effettuare una corretta diagnosi anatomopatologica, correlata a microstadiazione e a tutti i fattori prognostici istologici, necessari per pianificare la corretta gestione terapeutica del caso. Solo nel caso in cui la biopsia escissionale comporti una demolizione inaccettabile per la sede (es: volto, mani, piedi, orecchio) e per lesioni molto estese (es: lentigo maligna) può essere proposta una punch biopsy della zona pigmentata o rilevata della lesione. Se la biopsia di questi casi particolari dovesse rivelarsi insufficiente ne è fortemente raccomandata la ripetizione; recenti studi hanno dimostrato che questo tipo di approccio, se ben condotto, non condiziona negativamente la prognosi del paziente.¹⁷⁰

STADIAZIONE

Al momento della diagnosi di melanoma è necessario effettuare una corretta stadiazione clinica e strumentale, volta a scoprire sia una diffusione a livello regionale della malattia, sia una diffusione metastatica a distanza. La stadiazione del melanoma cutaneo oggi universalmente accettata, è quella proposta dall'AJCC nella settima edizione 2009, che si basa sul sistema TNM (Tumor, Node and Metastasis). (Fig.4)

American Joint Committee on Cancer

Melanoma of the Skin Staging

7th EDITION

Definitions

Primary Tumor (T)

Tx Primary tumor cannot be assessed (for example, curettaged or severely regressed melanoma)

T0 No evidence of primary tumor

Tis Melanoma in situ

T1 Melanomas 1.0 mm or less in thickness

T2 Melanomas 1.01–2.0 mm

T3 Melanomas 2.01–4.0 mm

T4 Melanomas more than 4.0 mm

NOTE: a and b subcategories of T are assigned based on ulceration and number of mitoses per mm², as shown below:

T CLASSIFICATION	THICKNESS (mm)	ULCERATION STATUS/MITOSIS
T1	≤1.0	a: w/o ulceration and mitosis <1/mm ² b: with ulceration or mitoses ≥1/mm ²
T2	1.01–2.0	a: w/o ulceration b: with ulceration
T3	2.01–4.0	a: w/o ulceration b: with ulceration
T4	>4.0	a: w/o ulceration b: with ulceration

Regional Lymph Nodes (N)

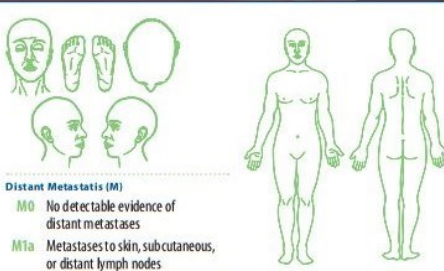
Nx Patients in whom the regional nodes cannot be assessed (for example, previously removed for another reason)

N0 No regional metastases detected

N1–3 Regional metastases based upon the number of metastatic nodes and presence or absence of intralymphatic metastases (in transit or satellite metastases)

NOTE: N1–3 and a–c subcategories assigned as shown below:

N CLASSIFICATION	NO. OF METASTATIC NODES	NODAL METASTATIC MASS
N1	1 node	a: micrometastasis ¹ b: macrometastasis ²
N2	2–3 nodes	a: micrometastasis ¹ b: macrometastasis ² c: in transit met(s)/satellite(s) without metastatic nodes
N3	4 or more metastatic nodes, or matted nodes, or in transit met(s)/satellite(s) with metastatic node(s)	



Distant Metastasis (M)

M0 No detectable evidence of distant metastases

M1a Metastases to skin, subcutaneous, or distant lymph nodes

M1b Metastases to lung

M1c Metastases to all other visceral sites or distant metastases to any site combined with an elevated serum LDH

NOTE: Serum LDH is incorporated into the M category as shown below:

M CLASSIFICATION	SITE	SERUM LDH
M1a	Distant skin, subcutaneous, or nodal mets	Normal
M1b	Lung metastases	Normal
M1c	All other visceral metastases Any distant metastasis	Normal Elevated

ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS									
Clinical Staging ³				Pathologic Staging ⁴					
Stage	Tis	NO	MO	0	Tis	NO	MO		
Stage IA	T1a	NO	MO	IA	T1a	NO	MO		
Stage IB	T1b	NO	MO	IB	T1b	NO	MO		
	T2a	NO	MO		T2a	NO	MO		
Stage IIa	T2b	NO	MO	IIA	T2b	NO	MO		
	T3a	NO	MO		T3a	NO	MO		
Stage IIb	T3b	NO	MO	IIB	T3b	NO	MO		
	T4a	NO	MO		T4a	NO	MO		
Stage IIc	T4b	NO	MO	IIC	T4b	NO	MO		
Stage III	Any T	≥ N1	MO	IIIA	T1–4a	N1a	MO		
					T1–4a	N2a	MO		
				IIB	T1–4b	N1b	MO		
					T1–4b	N2a	MO		
					T1–4a	N1b	MO		
					T1–4a	N2b	MO		
					T1–4a	N2c	MO		
				IIC	T1–4b	N1b	MO		
					T1–4b	N2b	MO		
					T1–4b	N2c	MO		
Stage IV	Any T	Any N	M1	IV	Any T	N3	MO		


Notes

¹ Micrometastases are diagnosed after sentinel lymph node biopsy and complete lymphadenectomy (if performed).

² Macrometastases are defined as clinically detectable nodal metastases confirmed by therapeutic lymphadenectomy or when nodal metastasis exhibits gross extracapsular extension.

³ Clinical staging includes microstaging of the primary melanoma and clinical/pathologic evaluation for metastases. By convention, it should be used after complete excision of the primary melanoma with clinical assessment for regional and distant metastases.

⁴ Pathologic staging includes microstaging of the primary melanoma and pathologic information about the regional lymph nodes after partial or complete lymphadenectomy. Pathologic Stage 0 or Stage IA patients are the exception; they do not require pathologic evaluation of their lymph nodes.



Financial support for AJCC 7th Edition Staging Posters provided by the American Cancer Society

Figure 4: Melanoma of the Skin Staging - American Joint Committee on Cancer 7th Edition 2009

La stadiazione risulta fondamentale per stabilire la prognosi, con diversi valori di sopravvivenza per ogni stadio e poter quindi instaurare il trattamento più adatto. (Fig.5)

STADIO	Sopravvivenza a 5 aa (%)	Sopravvivenza a 10 aa (%)
I A	95	88
I B	91-89	83-79
II A	77-79	64
II B	63-67	50-53
II C	45	32
IIIA	69-63	63-56
IIIB	52-46	47-36
IIIC	29-24	24-15
IV	19-7	16-6

Figura 5:Stadiazione e Sopravvivenza a 5 e 10 anni.

I criteri per la stadiazione includono lo stato del microstaging della lesione primaria ed i fattori prognostici istologici principali come mitosi ed ulcerazione che condizionano la stadio di malattia. Deve essere incluso lo studio dello status dei linfonodi regionali, stabilito con linfadenectomia parziale (linfonodo sentinella) o completa.¹⁷¹

La stadiazione può essere clinica e/o patologica. La prima comprende necessariamente la microstadiazione del tumore primitivo, asportato completamente, e la valutazione clinico-radiologica del paziente. Può essere applicata quindi solo dopo escissione completa del tumore primitivo. La stadiazione patologica comprende la microstadiazione del melanoma primitivo, e le informazioni anatomo-patologiche riguardanti lo status dei linfonodi regionali, dopo linfadenectomia parziale (tecnica del linfonodo sentinella) o completa; per gli stadi 0 ed 1A, non è richiesta valutazione anatomo-patologica dei linfonodi.¹⁷⁰

Non esiste ancora un consenso unanime sulle indicazioni all'applicazione delle diverse modalità diagnostiche per la stadiazione. Oggi il 50-70% dei melanomi è diagnosticato in fase precoce, con rischio di recidiva e diffusione inesistente per il melanoma in situ e molto basso per il melanoma in stadio IA. È importante quindi identificare quali siano le indagini più appropriate per questo tipo di pazienti, evitando quelle inutili o dannose. È infatti fondamentale modulare la scelta degli esami in funzione del rischio del paziente. Tra le metodiche attualmente impiegate l'ecografia appare la migliore nel rilevare le metastasi linfonodali mentre la PET-TC è risultata essere superiore alle altre metodiche nel rilevare la presenza di eventuali metastasi a distanza, con alta sensibilità ma bassa specificità. Questo comporta un alto numero di falsi positivi, per cui il suo uso non è indicato in pazienti a basso rischio, a meno che non siano presenti indicazioni cliniche precise. L'utilizzo di metodiche come la TAC encefalo-torace-addome o la PET-TC pertanto, è giustificato solo in caso di pazienti ad elevato rischio, ad esempio con tumore primitivo di elevato spessore (T4), con ulcerazione o con indice mitotico $>1\text{mm}^2$ (T4b), oppure

nel paziente con metastasi linfonodale evidente (stadio III). Sempre nel paziente ad alto rischio e/o metastatico, è possibile il dosaggio del LDH, in quanto consente di stratificare il rischio di morte del paziente. Per quanto riguarda il paziente a rischio intermedio, con tumore primitivo T2-T4a senza evidenza clinica di metastasi linfonodali, viene raccomandata l'esecuzione della radiografia standard del torace ed ecografia addome, ma la preferenza per queste indagini non è ancora unanime. Nel paziente a basso rischio (stadio IA) alcuni autori depongono a favore del solo esame clinico nel paziente asintomatico, altri ricorrono comunque allo studio ecografico dei bacini di drenaggio linfatico in quanto poco costoso, tollerato e ripetibile. Nel paziente con melanoma in situ, non deve essere eseguito nessun esame di stadiazione, ma è necessaria un'accurata visita dermatologica, al fine di escludere lesioni concomitanti.^{170,171}

TERAPIA e FOLLOW-UP

Dopo la biopsia escissionale, il cui ruolo principale è quello di confermare la diagnosi e fornire i fattori prognostici istologici del tumore primitivo, il trattamento chirurgico consiste nell'ampliamento dei margini di resezione. L'ampliamento ha lo scopo di minimizzare il rischio di recidiva locale. Il margine sano che deve essere ottenuto è variabile a seconda dello spessore di Breslow della lesione, parametro che oltre a correlare con la sopravvivenza, correla anche con il rischio di recidiva locale. Studi di meta-analisi effettuati per aumentare il potere statistico delle raccomandazioni, non hanno evidenziato una sopravvivenza differente tra pazienti che subivano escissioni ampie, con margini di escisione di 3-5cm, rispetto a pazienti che avevano margini più contenuti, di 1-2cm; è stata però rilevata una differenza nella sopravvivenza libera da malattia.¹⁷⁰

Sulla base delle attuali evidenze, in base allo spessore della lesione si considerano validi i seguenti margini di ampiezza:

- 1- melanoma in situ: 0,5cm,
- 2- melanoma \leq 2mm: 1cm,
- 3- melanoma da 2,01mm a 4mm: 2cm,
- 4- melanoma $>$ 4mm di spessore: 2cm.

Nei casi di lentigo maligna, lesione spesso a margini sfumati, possono essere necessarie asportazioni più ampie o tecniche di valutazione intraoperatoria dei margini, per poter raggiungere una corretta exeresi.¹⁷⁰

L'escissione deve spingersi fino alla fascia muscolare, che viene conservata, in quanto il risultato in termini di recidiva locale o a distanza, anche rimuovendola, non varia. Il pezzo operatorio, comprendente la cicatrice del precedente intervento, la cute ed il sottocute, deve essere orientato, ed inviato in anatomia patologica. Nella maggior parte dei casi è possibile chiudere la ferita attraverso un accostamento dei margini di escissione, mentre in altri è necessario adottare dei semplici lembi cutanei. In sedi particolari può essere necessario il ricorso ad innesti. Nei melanomi del letto ungueale, o della parte distale delle dita, può essere necessario procedere alla disarticolazione dell'ultima falange, o dell'articolazione metacarpo-falangea.¹⁷⁰

Tecnica del linfonodo sentinella

La tecnica del linfonodo sentinella è una procedura considerata minimamente invasiva, che permette di valutare lo status linfonodale e di individuare i pazienti con linfonodi metastatici, clinicamente non palpabili, candidati a dissezione linfonodale completa.²²

Nonostante oggi la maggior parte delle diagnosi di melanoma avvenga in pazienti con malattia localizzata, una percentuale significativa di questi tra il 15 e il 20% di questi pazienti al momento della diagnosi ha già sviluppato micrometastasi interessanti le stazioni linfatiche regionali, che daranno luogo allo sviluppo di metastasi linfonodali evidenti nella maggioranza dei casi, con un peggioramento della prognosi.¹⁷²

In caso di un singolo linfonodo metastatico la sopravvivenza a 10 anni risulta essere infatti ridotta del 50%.¹⁷³

La tecnica del linfonodo sentinella è stata introdotta nel 1992 da Morton, per consentire di identificare la presenza di micrometastasi linfonodali. Permette infatti di identificare i pazienti in stadio III occulto al momento della diagnosi, consentendo di applicare terapie chirurgiche più aggressive, come la dissezione linfonodale completa e terapie antineoplastiche sistemiche, solo in questo subset di pazienti, con l'obiettivo di migliorare la sopravvivenza. La prima sede della eventuale recidiva di malattia, dopo escissione del melanoma primitivo, è solitamente il bacino linfatico di drenaggio. Con la semplice osservazione clinica/ecografica del paziente dopo escissione del primitivo (*nodal observation*), il tasso di recidiva linfonodale risulta del 15-50% ed il tasso di metastatizzazione sistemica del 50%. Proponendo la dissezione linfatica elettiva in tutti i pazienti, si avrebbe solo un 15-20% di casi in cui potrebbe essere realmente vantaggiosa, con un forte aumento della morbilità per i pazienti. Studi prospettici randomizzati non hanno inoltre rilevato un aumento della sopravvivenza in pazienti in stadio I e II con tale approccio. L'esecuzione del linfonodo sentinella, per la determinazione dell'interessamento linfonodale

precoce, appare dunque la scelta più razionale. L'applicazione della dissezione nodale completa viene intrapresa solo in occasione di una positività riscontrata al sentinella.¹⁷⁰

La metodica si basa sul concetto che il drenaggio linfatico dalla cute ai linfonodi regionali avviene in maniera ordinata, e che il primo linfonodo ricevente il drenaggio linfatico dalla zona di insorgenza del tumore è quello con la maggiore probabilità di essere interessato per primo dalla metastatizzazione. La ricerca del linfonodo sentinella viene effettuata con la metodica combinata, che prevede l'iniezione di colorante blu vitale e radio-colloide (tracciante radiomarcato) nel sito della lesione primaria e l'esecuzione di una linfo-scintigrafia dinamica, che consente di individuare la zona di drenaggio ed il linfonodo. In sede operatoria l'utilizzo di una gamma camera, emettendo un segnale acustico, guida il chirurgo nella ricerca e nel prelievo del linfonodo. Con tale tecnica il linfonodo viene individuato nel 99% dei casi, ma percentuali più basse si riscontrano nei melanomi localizzati al capo-collo.¹⁷⁰

Grazie alla scintigrafia inoltre è possibile, nel 10% dei casi circa, identificare anche altri linfonodi di drenaggio in sedi insolite, aggiuntive, rispetto a quelli situate nelle tre zone più comuni (ascella, inguine, collo). Questi linfonodi vengono prelevati ed analizzati, in quanto sono da considerare comunque linfonodi sentinella a tutti gli effetti. La loro percentuale di interessamento da parte di micrometastasi infatti è del tutto simile a quella dei linfonodi situati in sedi classiche. La loro mancata presa in considerazione porterebbe ad una possibile sottostadiazione della malattia, con compromissione del risultato terapeutico. Oggi risulta inoltre possibile applicare la metodica SPECT-TC (Single Photon Emission Computed Tomography-TC) che consente, tramite tecnica "ibrida", di avere immagini ancora più dettagliate e precise, di regioni anatomicamente difficili come la testa o il collo, o di linfonodi situati molto vicino alle sedi primitive.¹⁷²

L'applicazione della metodica del linfonodo sentinella, con queste premesse, consente di predire lo stato dei linfonodi regionali con oltre il 95% di accuratezza, percentuale del tutto simile a ciò che si avrebbe con la dissezione linfonodale completa in elezione, che comporta però più complicità.^{34,172}

I pochi casi in cui un paziente classificato inizialmente come negativo, sviluppa poi metastasi linfonodali evidenti (falsi negativi, 4-5% dei casi) possono essere dovuti a:

- 1- mancata rilevazione/prelievo di un linfonodo sentinella (nel caso di più linfonodi marcati, vanno comunque tutti asportati),
- 2- la metodica è stata correttamente applicata, ma al momento c'erano delle metastasi microscopiche in-transit non ancora arrivate al sito di drenaggio regionale,

3- il linfonodo è stato correttamente asportato, ma il suo interessamento non è stato rivelato per l'esiguo numero di cellule neoplastiche presenti, o per la presenza di micro metastasi in un punto del linfonodo non analizzato dal patologo.¹⁷²

Le attuali indicazioni per l'analisi anatomico-patologica delle sezioni del linfonodo sentinella raccomandano l'uso, oltre che di sezioni all'ematossilina-eosina, di metodi immuno-istochimici che utilizzano ad esempio anticorpi anti-MART1, HMB45, e S-100, per incrementare le possibilità di identificazione di eventuali cellule neoplastiche. Non esiste tuttavia un protocollo standardizzato che stabilisca il numero minimo di sezioni istologiche o i marcatori immuno-istochimici da impiegare. Attualmente si raccomanda l'utilizzo del protocollo di campionamento estensivo dell'EORTC Melanoma Group.¹⁷⁰

La percentuale di complicanze locali della metodica risulta contenuta e corrisponde al 10% dei casi. Tra le più frequenti si annoverano: linfedema, linfocele, axillary web syndrome, parestesie/anestesi dovute a lesioni nervose durante la metodica, linfangite. È doveroso sottolineare che molte di queste complicazioni manifestano transitorietà.¹⁷⁰

Recenti studi hanno dimostrato come la biopsia del linfonodo sentinella sia capace di incrementare la sopravvivenza libera da malattia, specie nei pazienti con spessore del melanoma compreso tra 1,2 e 3,5mm definiti pazienti a rischio intermedio (71,3% di sopravvivenza libera da malattia a 10 anni contro 64,7% nei pazienti in cui non si esegue la tecnica).¹⁷⁴

Tra i pazienti con metastasi linfonodali si evidenziano differenze statisticamente significative di sopravvivenza, infatti i pazienti con linfonodo sentinella positivo sottoposti a precoce linfadenectomia loco regionale, mostrano una sopravvivenza a 10 anni del 62.1%, rispetto al 41.5% di quelli sottoposti a linfadenectomia differita, eseguita comunque solo in seguito a riscontro clinico di metastasi linfonodali durante il follow-up clinico/strumentale. Questo a dimostrazione dell'esistenza di un vantaggio di sopravvivenza correlato alla metodica in questi pazienti.^{24,174}

Il valore prognostico del linfonodo sentinella è stato chiaramente dimostrato: nei pazienti con melanomi di spessore compreso tra 1,2 e 3,5mm, in caso di positività del linfonodo sentinella, la sopravvivenza melanoma-specifica a 10 anni è del 62,1%, rispetto al 85,1% dei pazienti con linfonodo indenne. All'analisi multivariata lo status del linonodo sentinella risulta essere un fattore prognostico indipendente.^{175,176}

Secondo le linee guida attualmente in uso la tecnica del linfonodo sentinella risulta attualmente indicata in caso di spessore di Breslow compreso tra 1,0 mm - 4,0 mm ed in caso di spessore >4mm. Linfonodi positivi vengono riscontrati nel 10-20% dei casi nel primo gruppo e nel 30-

40% dei casi nel secondo. Nei pazienti con melanoma sottile (<1mm) ma con presenza di fattori prognostici negativi come numero di mitosi elevato ($\geq 1/\text{mm}^2$) oppure ulcerazione (stadio IB), è possibile effettuare il linfonodo sentinella ma l'indicazione va discussa con il paziente.^{170,177}

Metastasi linfonodali

I linfonodi locoregionali rappresentano la sede di più frequente di metastatizzazione. Il bacino linfatico interessato dipende dalla localizzazione cutanea della lesione primitiva:

- per il distretto testa-collo sono considerati locoregionali i linfonodi latero-cervicali,
- per i tumori localizzati al tronco sopra la linea di Sappey (ombelico-cresta iliaca-seconda vertebra lombare) e dell'arto superiore sono considerati loco-regionali i linfonodi ascellari,
- per i melanomi del tronco sotto la linea di Sappey e nei melanomi dell'arto inferiore si considerano loco-regionali i linfonodi inguinali.¹⁷⁰

Talvolta la sede cutanea interessata dal melanoma primitivo può drenare in sedi multiple, anche controlaterali, oppure in sedi non prevedibili. La chirurgia dei linfonodi loco regionali ha come principali indicazioni la positività del linfonodo sentinella oppure il riscontro all'esame clinico/strumentale di metastasi linfonodali sia al momento della diagnosi che durante il follow-up rappresentano le principali indicazioni alla chirurgia dei linfonodi loco regionali.²⁴

Questa tecnica rappresenta un atto volto principalmente al controllo locale della malattia.¹⁷⁰ L'intervento consiste nella dissezione completa del bacino linfonodale interessato. A livello laterocervicale si devono asportare tutti i cinque livelli linfonodali e può anche essere presa in considerazione la parotidectomia superficiale, in caso di melanoma dell'emivolto omolaterale ed evidenza di coinvolgimento di linfonodi intraparotidei. Se la stazione linfonodale colpita è quella ascellare, devono essere asportati tutti e tre i livelli linfonodali. In caso di localizzazione a livello inguinale, dovrebbero essere asportati i linfonodi inguinali, iliaci ed otturatorî.

Metastasi in transit

La diffusione linfatica regionale denominata "metastasi in transit" o "satellitosi", si compone di localizzazioni multifocali, sia cutanee che sottocutanee, tra la sede primitiva del tumore e la stazione di drenaggio linfatico regionale corrispondente. Rappresenta un evento importante, infatti il 20% delle recidive di melanomi cutanei avviene mediante metastasi in transit o per satellitosi. La prognosi di questi pazienti peggiora sensibilmente, solo il 30% infatti sembra

sopravvive a 5anni. Le scelte terapeutiche da attuarsi possono essere diverse, e variano a seconda di numero, dimensioni e sede delle lesioni in transit. In caso di lesione singola o basso numero di lesioni, può essere proposta l'asportazione chirurgica, con eventuale esecuzione del linfonodo sentinella.¹⁷⁸

In caso di metastasi multifocali o di difficile asportazione, la chirurgia risulta controindicata. Si ricorre in questi casi a terapie sistemiche: perfusione ipertermica antiblastica isolata dell'arto, infusione isolata dell'arto ed elettrochemioterapia (ECT). La perfusione ipertermica antiblastica isolata dell'arto consiste nel perfondere, dopo aver chirurgicamente incanalato i vasi e in condizioni di ipertermia per potenziare l'effetto farmacologico, alte dosi di chemioterapici o associazioni di più farmaci (es:Melphalan+TNF) in modo da ottenere concentrazioni tissutali 10-100 volte superiori rispetto a quelle raggiungibili con la somministrazione sistemica, generando minori effetti collaterali. La metodica risulta però gravata dallo 0,5-1% di casi di tossicità grave dell'arto, con successiva amputazione.¹⁷⁰

L'infusione isolata dell'arto invece, effettuata tramite metodica percutanea, in normotermia, senza ossigenatore in ipossia ed acidosi, risulta essere pratica meno invasiva e meglio tollerata.¹⁷⁰

L'elettrochemioterapia si basata sul principio biofisico dell'elettroporazione, cioè la capacità dei campi elettrici esterni di aumentare la permeabilità delle membrane cellulari a varie sostanze tra cui i farmaci chemioterapici. La tecnica, recentemente standardizzata dallo studio ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemiotherapy), prevede l'applicazione di brevi ed intensi impulsi elettrici tramite un elettrodo in anestesia locale ed è possibile sia la somministrazione venosa che locale del farmaco. Possono essere svolte più sedute terapeutiche, ma risulta più difficile ottenere risposte complete con lesioni numerose o >3cm. L'ECT è una metodica promettente, che può essere impiegata in caso di fallimento o inapplicabilità delle altre tecniche ed è òla sola che risulta applicabile in tutto l'ambito corporeo.¹⁷⁰

Delle tre tecniche citate la perfusione isolata dell'arto è quella che garantisce un maggior numero di risposte complete; tale fattore influenza positivamente la sopravvivenza del paziente, per cui, se applicabile, rappresenta ad oggi la metodica di scelta. L'infusione è un valido compromesso nel paziente anziano/fragile, dato il minor numero di complicanze e la maggiore semplicità esecutiva.¹⁷⁹

Trattamento chirurgico delle metastasi a distanza

Il sistema nervoso centrale, il polmone ed il fegato rappresentano le sedi più comuni di metastatizzazione del melanoma cutaneo. Meno frequentemente vengono interessate cute, osso e apparato gastrointestinale; si possono verificare anche metastatizzazioni a sede insolita. La chirurgia delle localizzazioni metastatiche può essere intrapresa con due finalità: palliativa o curativa. La prima consiste nel raggiungere il trattamento di un sintomo che incide negativamente sulla qualità della vita del paziente, la seconda consente di raggiungere invece, in casi molto selezionati, sopravvivenze del 30% a 5anni, difficilmente ottenibili con altre terapie.¹⁷⁰

Ogni singolo caso dovrebbe essere discusso da un panel multidisciplinare di esperti, per decidere la fattibilità di un approccio curativo chirurgico nel paziente metastatico. Il riscontro di malattia in stadio sempre più precoce ed il grande miglioramento delle tecniche di imaging, consentono oggi di rilevare metastatizzazioni dimensionalmente e numericamente più limitate, a volte passibili di trattamento chirurgico. Alcuni dei fattori che vengono presi in considerazione per decidere la fattibilità della chirurgia con intento curativo sono:

- sede di metastatizzazione (cute, sottocute, linfonodi extraregionali, apparato GI sono associati a prognosi migliore, fegato e cervello a prognosi peggiore),
- numero di metastasi (più di tre metastasi in un singolo organo depongono per scarsa sopravvivenza),
- numero di organi interessati (per più di 3 la prognosi rimane comunque pessima),
- intervallo libero da malattia (se >36 mesi è un fattore indicativo di possibile lunga sopravvivenza),
- tempo di raddoppiamento delle metastasi, specie se polmonari (se <60 giorni la sopravvivenza a 5anni risulta essere pari a 0),
- dosaggio dell'LDH sierico.¹⁷⁰

Ai fini della decisione chirurgica grande peso ricopre anche il performance status del paziente.¹⁷⁰

Terapia adiuvante

La terapia adiuvante risulta indicata in casi in cui il rischio di ricaduta è maggiormente elevato. Lo scopo è quello di ridurre il rischio di recidive e di migliorare le percentuali di sopravvivenza.

La stadiazione AJCC permette di identificare pazienti a diverso rischio di ricaduta: gli stadi IB e IIA, rientrano nel basso rischio di ricaduta, mentre gli stadi IIB-C e qualunque stadio III, vengono considerati ad alto rischio di ricaduta.¹⁷⁰

Nel melanoma in Stadio I non deve essere eseguito alcun trattamento adiuvante, data la generale buona prognosi dei pazienti, mentre nello stadio IIA può essere preso in considerazione un trattamento con Interferone α a basse dosi, per 18 mesi, in base alla presenza di alcuni fattori prognostici istologici svavorevoli quali l'indice mitotico elevato ed uno spessore di Breslow superiore a 1,5mm. Possono essere considerati come utili criteri decisionali anche altri fattori prognostici non istologici, come il sesso (il sesso maschile viene considerato più a rischio di recidiva) e la localizzazione (quelle al dorso o al testa/collo sembrerebbero essere prognosticamente peggiori). Nello stadio IIB dovrebbe essere eseguito trattamento con Interferone α a basse dosi, per 18-24 mesi. Nel melanoma in stadio IIC-III dovrebbe essere eseguito un trattamento con interferone a basse dosi o ad alte dosi, a seconda delle caratteristiche del paziente e/o dell'esperienza del centro. Per lo stadio IIIC, se possibile, è raccomandato l'utilizzo di Interferone α ad alte dosi, perché sembra essere l'unico dosaggio ad avere un impatto favorevole sulla prognosi; attualmente, al di fuori di questa indicazione, non esistono studi che siano in grado di indicare il dosaggio ottimale, o la durata ottimale del trattamento.¹⁷⁰

Secondo recenti dati provenienti da metanalisi che hanno compreso migliaia di pazienti, il trattamento riduce del 18% il rischio relativo di recidiva e dell'11% quello di morte.²⁴

Nel 2014 sono stati presentati i primi dati dello studio EORTC 18071 che ha valutato l'efficacia in adiuvante con Ipilimumab, anticorpo monoclonale anti CTLA4, nel melanoma in stadio III. Lo studio, randomizzato e in doppio cieco, prevedeva una durata del trattamento di 3 anni ed ha dimostrato una riduzione del rischio di recidiva del 25% a 5 anni. Sono state però state segnalate tossicità gravi per cui non è una terapia al momento attuabile al di fuori di studi clinici. Sono in corso anche altri studi con farmaci a bersaglio molecolare come terapia adiuvante. L'utilizzo della radioterapia come terapia adiuvante, è stato associato ad un miglior controllo delle recidive locali ma non comporta un miglioramento della sopravvivenza e causa numerosi effetti collaterali (es: dermatiti attiniche, sieromi, infezioni), per cui è un trattamento sconsigliato, tranne in casi selezionati.²⁴

Terapia medica della malattia metastatica

Fino a pochi anni fa lo scopo del trattamento della malattia metastatica non operabile poteva considerarsi quasi esclusivamente palliativo, dal momento che i chemioterapici a disposizione

hanno dimostrato nel corso degli anni un effetto limitato e non curativo nella maggior parte dei casi, con sopravvivenze medie di pochi mesi e con meno del 5% dei pazienti vivi a 5anni. Negli ultimi anni il progressivo affermarsi di nuovi farmaci ha permesso di osservare dei vantaggi in termini di sopravvivenza, come nel caso dell'Ipilimumab o dei farmaci BRAF inibitori Vemurafenib e Dabrafenib.^{24,170}

Sono a disposizione dei clinici anche altri approcci, ad esempio l'immunoterapia con Interleuchina-2, che ha dimostrato una certa attività: quando somministrata per via endovenosa ad alte dosi, è in grado di indurre una percentuale di risposte obiettive del 16%, con il 6-7% di risposte complete, il 50% delle quali permane dopo molti anni. La tossicità del trattamento risulta essere però elevata (es: sindrome da iperpermeabilità capillare, con conseguente rischio di edema polmonare, insufficienza renale, ipotensione e disfunzioni cardiache) ed a fronte del basso numero di risposte il trattamento non è approvato in Europa (ma è approvato dalla FDA in USA ed incluso nelle linee guida NCCN).^{24,170}

Il trattamento immunoterapico meglio caratterizzato ed oggi disponibile, per la malattia metastatica, è la terapia con ipilimumab. Si tratta di una immuno-target-therapy, in quanto operata tramite anticorpi monoclonali specificatamente diretti contro un target, che agiscono sul sistema immunitario del paziente e non direttamente sulla neoplasia. Altre molecole attualmente in studio, sempre appartenenti a questa classe farmacologica, sono il nivolumab e l'ambrolizumab.²⁴

L'ipilimumab è un anticorpo monoclonale diretto contro il recettore CTLA-4 dei linfociti T attivati. Il legame di CTLA-4 con il suo ligando naturale, la molecola B7, genera un segnale disattivante la risposta immunitaria e tale via di segnalazione è sfruttata dalle cellule tumorali per indurre anergia nei linfociti T. Il legame del farmaco al CTLA-4 impedisce l'insorgere dello stato di anergia, traducendosi in un potenziamento dell'azione del sistema immunitario del paziente. Si tratta del primo farmaco che ha dimostrato di comportare un beneficio di sopravvivenza in un consistente numero di pazienti con melanoma metastatico. Secondo gli studi attuali, la sopravvivenza a 3 anni del paziente metastatico che riceve terapia con ipilimumab è del 20,8% (contro il 12,2% dei pazienti che hanno ricevuto placebo). Tale immunoterapia ha ricevuto l'approvazione della FDA e dell'EMA per il trattamento del melanoma metastatico. Nel febbraio 2013 l'AIFA ha approvato la rimborsabilità del trattamento con ipilimumab nei pazienti affetti da melanoma avanzato pretrattati e recentemente anche per la prima linea. Il farmaco viene somministrato alla dose di 3 mg/Kg ogni 3 settimane, per 4 somministrazioni totali.¹⁸¹

La risposta alla terapia somministrata può essere diversa da quella attesa con i classici

chemioterapici, in particolare si segnalano numerose risposte tardive, verificatesi a distanza di mesi dal trattamento, dopo periodi di apparente progressione della malattia o dopo la comparsa di nuove lesioni. Gli effetti collaterali, immuno-correlati, come affaticamento, diarrea, e colite compaiono nella maggior parte dei casi nelle prime 12 settimane di terapia. Sono state inoltre riportate tossicità epatiche, tiroidee e ipofisarie, tutte ad origine autoimmune. Gli effetti avversi immuno-correlati più frequenti sono però quelli riguardanti l'ambito cutaneo. Tra questi il rash risulta essere il più comune con carattere maculo-papulare, diverso da quello riscontrato con altri farmaci target oncologici impiegati nella cura di altre neoplasie, come Erlotinib o Cetuximab.¹⁸² Altro effetto avverso cutaneo riscontrato frequentemente è rappresentato dal prurito, esso può accompagnare il rash, ma può anche essere presente in assenza di lesioni cutanee. Alopecia e vitiligine sono altri possibili effetti collaterali, tra i rari si annovera la sindrome di Stevens-Johnson. Il trattamento delle tossicità dermatologiche prevede l'utilizzo di corticosteroidi topici ed anti-istaminici orali per i casi più lievi, corticosteroidi sistemici (1-2mg/kg/die di prednisone o equivalenti) nei casi di prurito grave, a cui è possibile associare anche l'utilizzo di gabapentin, pregabalin, mirtazapina o aprepitant.¹⁸³

Ulteriori farmaci immunoterapici attualmente in sviluppo sono nivolumab e pembrolizumab, diretti contro l'interazione tra PD1 e PD1-ligando. L'anergia delle cellule T si può ottenere anche per l'interazione tra PD1 (molecola espressa sulla superficie dei linfociti) e PDL1, espressa sulle cellule presentanti l'antigene e su alcune cellule tumorali e tessuti. Recenti studi hanno dimostrato attività ed efficacia della combinazione di anti CTLA-4 e anti PD-1. Un iniziale studio di fase I che ha combinato ipilimumab e nivolumab, ha evidenziato un tasso di risposte obiettive fino al 53%. Successivamente, la combinazione di ipilimumab (antiCTLA4) e nivolumab (antiPD1) ha dimostrato in uno studio di fase II randomizzato in prima linea (combinazione vs ipilimumab single agent) un tasso di risposte obiettive pari al 61% nei pazienti con BRAF wild-type e al 52% nei pazienti con mutazione di BRAF. In entrambi le cohorti il tasso di risposte complete è stato del 22%. La mediana del PFS non è stata raggiunta nel gruppo wildtype mentre è stata pari a 8.5 mesi nel gruppo BRAF mutato. L'ipilimumab come agente singolo ha dimostrato un tasso di risposte obiettive più basso, pari al 10-11%.^{24,181}

In data 23 aprile 2015, il nivolumab è stato approvato dall'EMA per il trattamento del melanoma avanzato in prima e successive linee di trattamento indipendentemente dallo status mutazionale. Il pembrolizumab, è stato approvato dall'EMA nelle stesse indicazioni del nivolumab il 22 maggio 2015; nel settembre 2014 era già stato approvato da FDA per il trattamento di pazienti con melanoma avanzato e resistenti al trattamento con ipilimumab (in caso di positività alla mutazione di BRAF devono aver ricevuto anche un trattamento con inibitori di BRAF).

Attualmente in Italia il trattamento con farmaci diretti contro PD-1 (nivolumab e ipilimumab) è disponibile solo nell'ambito di programmi di Expanded Access (EAP) dopo trattamento con ipilimumab o in studi clinici.²⁴

L'efficacia di vemurafenib e dabrafenib, nella terapia del melanoma metastatico, è già stata ampiamente dimostrata e sulla base di tali risultati il vemurafenib è stato approvato nel trattamento del melanoma avanzato con mutazione V600 del gene B-RAF, dall'FDA nell'agosto 2011 e dall'EMA nel febbraio 2012, successivamente è stato approvato dall'AIFA in Italia. Si tratta di farmaci attivi contro melanomi caratterizzati, a livello molecolare, dalla mutazione V600 e non attivi su cellule tumorali che non albergano la mutazione. La percentuale di risposte globali con il vemurafenib ammonta al 53%, con una riduzione relativa del rischio di morte del 38% e di progressione della malattia del 66%. L'incremento mediano della sopravvivenza è di 3 mesi rispetto ai pazienti trattati con chemioterapia classica (13,6 mesi di sopravvivenza mediana con vemurafenib, contro 9,7 dei pazienti trattati con chemioterapia). La tossicità riscontrata è prevalentemente cutanea, con la presentazione di fotosensibilizzazione, rash, cheratoacantomi e carcinomi squamocellulari. Artralgie ed astenia sono state riportate rispettivamente nel 21% e nel 13% dei casi.²⁴

Nei pazienti affetti da melanoma inoperabile o metastatico (stadio IIIc o IV) è pertanto raccomandata la valutazione dello stato di BRAF e in presenza di mutazione V600 è indicato il trattamento con vemurafenib. Un ulteriore farmaco a bersaglio molecolare disponibile per i melanomi BRAF mutati è dabrafenib. Anch'esso si è dimostrato più efficace della chemioterapia tradizionale, con un profilo di tossicità del tutto simile al vemurafenib. L'iperpiressia rappresenta l'evento avverso peculiare rispetto agli altri farmaci. Il trattamento è stato approvato dal FDA nel maggio 2013 e dall'EMA nell'agosto 2013 per il melanoma avanzato con mutazione V600 del gene B-RAF, in Italia è stato approvato nell'ottobre 2014. Il limite maggiore dei BRAF-inibitori è la breve durata della risposta, infatti solo una piccola parte dei pazienti è ancora in terapia dopo due anni di trattamento. In genere si tratta di pazienti con piccolo carico di malattia iniziale mentre nei pazienti con carico maggiore è probabile che si sviluppi piuttosto precocemente resistenza al trattamento.^{24,170}

Il trametinib è un altro farmaco che ha dimostrato efficacia in pazienti con mutazione di BRAF e melanoma avanzato garantendo una sopravvivenza libera da progressione di lunga durata rispetto alla chemioterapia tradizionale (mediana 4.8 contro 1.5 mesi) e sopravvivenza maggiore. Il trametinib è un inibitore di MEK (mitogen-activated protein kinase), via molecolare situata a valle di BRAF. È risultata efficace anche la terapia di combinazione tra trametinib e dabrafenib,

anche se il risultato rispetto al dabrafenib in monoterapia non è clinicamente significativo (incremento della sopravvivenza libera da progressione da 8,8mesi a 9,3mesi), ma le tossicità dei BRAF inibitori risultano attenuate con la combinazione.¹⁸¹

L'aggiunta di un inibitore di MEK, come il trametinib, alla terapia con BRAF inibitori potrebbe rivelarsi utile per by-passare la resistenza acquisita a questi ultimi, nel caso siano presenti meccanismi di resistenza MEK-dipendenti.¹⁷⁰

I farmaci inibitori di MEK inoltre sembrano possedere anche efficacia anche nei confronti di melanomi NRAS mutati, per i quali non esiste ad oggi terapia target.¹⁸⁴

Nel caso di melanomi delle mucose, delle zone acrali e delle aree esposte cronicamente al sole, è stata dimostrata la presenza di mutazioni del gene c-Kit che comportano la risposta al trattamento con c-Kit inibitori (imatinib e nilotinib). Diverse esperienze cliniche evidenziano risposte importanti con l'uso di c-kit inibitori nei melanomi che presentano mutazioni all'esone 9, 11, o 13. Studi al riguardo, con casistiche più ampie, sono attualmente in corso.²⁴

Anche se l'ipilimumab e i farmaci BRAF e MEK inibitori hanno significativamente modificato lo scenario terapeutico del melanoma metastatico, vi sono limitazioni che impongono ulteriori studi. I futuri studi clinici cercheranno di migliorare l'efficacia di tali farmaci attraverso il disegno di regimi di combinazione o sequenziali sia con entrambi i farmaci sia associati ad altri chemioterapici, immunoterapici o farmaci a bersaglio molecolare. In particolare, si valuterà come coniugare i differenti pattern di risposta di questi due approcci: rapida e significativa riduzione del volume tumorale, anche in presenza di importante disease burden (BRAE inibitori); attività minore, lenta ma protratta nel tempo (ipilimumab). La tossicità epatica limitante emersa dallo studio di fase I sulla combinazione vemurafenib + ipilimumab, evidenzia la necessità di studiare in modo appropriato le possibili sequenze e combinazioni. Anche la rivalutazione di malattia dovrà tener presente la tipologia di risposte osservate con l'ipilimumab, che includono anche la possibilità iniziale di comparsa di nuove lesioni o di aumento del volume tumorale complessivo, suscettibile successivamente di risposta tardiva e duratura.²⁴

Per quanto riguarda i chemioterapici tradizionali, gli unici tre farmaci che hanno dimostrato di possedere debole attività nel melanoma metastatico sono fotemustina, dacarbazina e temozolomide, ma nessuno dei tre ha dimostrato di poter migliorare il dato della sopravvivenza. La dacarbazina e la temozolomide sono in grado di attraversare la barriera emato-encefalica e possono rivestire pertanto un ruolo nel paziente con metastasi cerebrali. Il trattamento con chemioterapia trova oggi indicazione dopo trattamento con farmaci BRAE inibitori o con ipilimumab. La radioterapia può essere usata solo come terapia palliativa, non è infatti in grado

di modificare la sopravvivenza, in caso soprattutto di metastasi cerebrali. La radioterapia palliativa è inoltre utile in caso di lesioni osse sintomatiche ed a rischio di frattura e può rivelarsi utile per il controllo della sintomatologia su varie localizzazioni metastatiche, tra cui: vertebre, linfonodi addominali o pelvici (che possono provocare dolore per compressione o stasi linfatica), lesioni cutanee e sottocutanee ulcerate e sanguinanti, masse linfonodali mediastiniche.²⁴

Trattamento delle recidive locali

I secondarismi cutanei di melanoma sono definiti in base alla distanza che intercorre tra loro e la lesione primitiva.¹⁸⁵

Si suddividono in:

- recidive locali “vere”, (lesione in contiguità della cicatrice chirurgica e con componente in situ),
- satellitosi/metastasi in transit, (lesione cutanea-sottocutanea posta entro 5cm dalla primitiva o entro 2cm dalla cicatrice, o che supera questi limiti, localizzandosi tra la lesione primaria ed il sito di drenaggio),
- metastasi a distanza (lesioni cutanee secondarie, localizzate in qualsiasi distretto, che non soddisfano i criteri precedenti).^{185,86}

È importante distinguere le recidive locali “vere”, definite come la ricomparsa del melanoma con presenza di una componente istologica di neoplasia in situ chiaramente identificabile, all’interno o in contiguità con la cicatrice chirurgica (recidiva su cicatrice, “true local scar recurrence” o “persistent disease” secondo linee guida NCCN).^{169,185}

Questa evenienza è considerata il risultato di una incompleta escissione della malattia, è ad oggi di raro riscontro, ma ha buona prognosi, al contrario delle altre forme di secondarismi cutanei. In caso quindi di sospetta recidiva locale su cicatrice del precedente intervento, la diagnosi può essere posta con biopsia escissionale secondo linee guida NCCN (National Comprehensive Cancer Network). Il paziente deve essere stadiato nuovamente mediante adeguati esami strumentali, la lesione escissa con 2 cm di margine, e può essere presa in considerazione l’esecuzione del linfonodo sentinella in accordo con le caratteristiche istologiche della malattia. Dopo l’intervento chirurgico esiste l’opzione di trattamento con interferone a seconda dei parametri di stadiazione.^{24,169}

A livello clinico è molto importante rilevare che spesso le recidive di melanoma su cicatrice sono costituite da lesioni pigmentate che crescono direttamente a partire dalla cicatrice stessa, espandendosi nel tessuto sano circostante. Talvolta è possibile osservare questa evenienza non solo dopo l'asportazione di un melanoma, ma anche dopo l'asportazione di un nevo displastico, a distanza di mesi o anni dall'intervento, o di lesioni che erano state classificate come nevi melanocitici del tutto benigni. In ogni caso, indipendentemente dalla lesione precedentemente asportata, l'accrescimento di una nuova lesione pigmentata a partire dalla cicatrice con espansione nel tessuto circostante, rappresenta un segno fortemente sospetto della presenza di cellule maligne. In una recente serie di casi clinici, all'esame istologico è sempre stato rilevato un melanoma, spesso in situ.¹⁸⁷

Tradizionalmente, la satellitosi è stata definita come una lesione secondaria localizzata entro 5cm dalla lesione primitiva, o entro 2cm dalla cicatrice escissionale, mentre le metastasi in transit sono state definite come lesioni poste a distanza maggiore, localizzate tra la lesione primitiva ed il sito di drenaggio linfatico loco-regionale. Oggi queste lesioni vengono considerate, in entrambi i casi, il risultato di una diffusione tumorale lungo le vie di drenaggio linfatico, con prognosi simile, assimilabile a quella di un paziente con metastatizzazione linfonodale (come da stadiazione TNM AJCC), assai peggiore quindi rispetto a quella di una recidiva locale "vera". Le metastasi cutanee a distanza hanno prognosi ancora peggiore (stadio IV TNM), ma migliore rispetto ad altre localizzazioni sistemiche.¹⁸⁵

Follow-up del paziente

La sorveglianza delle lesioni pigmentate della cute, attraverso una visita annuale specialistica, deve essere fortemente raccomandata in tutti i pazienti con anamnesi positiva per melanoma anche in fase iniziale (in situ). La frequenza dei controlli dovrebbe essere comunque determinata individualmente, in base anche alla presenza di altri fattori di rischio (anamnesi familiare, presenza di nevi displastici, numero di nevi, fototipo). E' utile educare il paziente alla skin self examination ed all'autopalpazione delle stazioni linfonodali regionali. Per i pazienti con melanoma in stadio IA viene consigliato un controllo clinico specialistico a cadenza semestrale per almeno tre anni. Per i pazienti in stadio IB-III viene consigliata una visita clinica specialistica ogni 3-6 mesi per i primi 3 anni, quindi ogni 4-12 mesi per ulteriori 2 anni ed in seguito annualmente.²⁴

A livello internazionale non c'è uniformità nel considerare i controlli ecografici periodici delle stazioni linfonodali regionali per questi pazienti, ad ogni modo da alcuni viene consigliato tale

monitoraggio (ogni 6-12 mesi) per i melanomi in stadio IB, specialmente (ma non solo) se non è stato asportato il linfonodo sentinella, con identica raccomandazione per lo stadio II, con monitoraggio clinico semestrale e monitoraggio ecografico ogni 6-3 mesi per lo stadio III.¹⁸⁸ Attualmente si ritiene potenzialmente indicato l'utilizzo di esami strumentali di imaging complessi (TAC, PET, RMN) solo per melanomi a medio-alto rischio di recidiva (stadio IIC-III), con cadenza semestrale per i primi tre anni di follow-up e poi annuale fino al 5° anno. Dopo i primi tre anni gli esami radiologici di routine, compresi Rx torace, ecografia addominale ed esami ematochimici, possono essere eseguiti ogni 6-12 mesi. La durata ottimale del follow-up non è ancora stata chiarita in quanto la ricaduta nei soggetti affetti da melanoma avviene generalmente nei primi 5 anni, ma ricadute a distanza maggiore, talvolta anche oltre i 10 anni dall'atto chirurgico, sono documentate anche nei pazienti con melanomi sottili.¹⁴⁴ È fortemente consigliata una visita specialistica dermatologica annuale per il resto della vita in tutti i soggetti che hanno anamnesi positiva per melanoma, dato il rischio pari al 4-8% di sviluppare un secondo melanoma.²⁴

I POLIMORFISMI GENETICI

SIGNIFICATO, POLIMORFISMI GENETICI E MELANOMA

La conoscenza dei polimorfismi genetici deriva dai primi studi sul sistema ABO dei gruppi sanguigni e su numerose altre proteine che si possono riscontrare, nei diversi individui, in versioni differenti, per la presenza di una sequenza aminoacidica lievemente dissimile (isoforme), con differenze anche a livello di sequenza nucleotidica del DNA. Un locus, una posizione nel genoma, o anche un gene, è considerato polimorfico se i suoi alleli, ovvero le sue differenti espressioni nella popolazione, sono tali che il più comune ha una frequenza inferiore al 99%. Se il locus in questione risulta bi-allelico, cioè possiede solo due varianti, il meno comune sarà presente all'interno della popolazione in esame con una frequenza maggiore dell'1%. I polimorfismi genetici sono quindi variazioni nella sequenza del DNA osservabili tra diversi individui; nell'uomo il 99,9% del genoma è identico tra diversi individui, mentre lo 0,1% è variabile e la gran parte di questa quota di variazione è dovuta alla presenza di polimorfismi.¹⁸⁹ Esistono differenti tipi di polimorfismi genetici, di differenti dimensioni, da un singolo nucleotide a varie centinaia. Si tratta in ogni caso del risultato di una mutazione del DNA ed i differenti tipi di polimorfismo dipendono dal tipo di mutazione che li ha creati.¹⁹⁰

Il polimorfismo più semplice è la sostituzione di un nucleotide con un altro (*single nucleotide polymorphism* - SNP - polimorfismo a singolo nucleotide). Si tratta del tipo di polimorfismo genetico più frequente nella popolazione umana, la gran parte della differenza genetica tra gli individui dipende dalla presenza di SNP.¹⁹¹

Altri tipi di polimorfismi possono essere i polimorfismi dei frammenti di restrizione del DNA (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) o i polimorfismi di inserzione/delezione di sequenze di DNA. Questi ultimi sono anche detti "polimorfismi di lunghezza di sequenze semplici" (SSLPs, Simple Sequence Length Polymorphisms), comprendono le "ripetizioni in tandem di numero variabile" (VNTRs, Variable Number Tandem Repeat o minisatelliti), e le più brevi "ripetizioni in tandem semplici" (STRs, Short Tandem Repeats o microsatelliti). I primi sono costituiti da unità di 15-100 nucleotidi, ripetute numerose volte, fino alla lunghezza di 1-15kb, disperse nel genoma. I secondi sono costituiti da sequenze molto semplici, spesso dinucleotidi, il più comune dei quali risulta la sequenza "CA", ripetuti un numero variabile di volte, con lunghezze inferiori ai minisatelliti. Queste sequenze ripetute possono essere di

lunghezza estremamente variabile tra individui differenti, con la presenza di molti alleli nella popolazione. I polimorfismi a singolo nucleotide sono però i polimorfismi più numerosi nel genoma e si stima che in un singolo individuo possano essere presenti con la frequenza di 1 ogni 0,3-1kb. SNP posizionati lungo il DNA in prossimità tra di loro, possono essere ereditati in blocco, mostrando di essere in linkage-disequilibrium e creando dei differenti aplotipi (insiemi di alleli coereditati).¹⁹⁰

Gli SNP non sono distribuiti omogeneamente nel DNA in quanto si conoscono zone con concentrazione più alta e non risultano omogenei per classe di appartenenza. Queste differenze sono probabilmente un effetto della selezione naturale, i “non sense SNP“ hanno infatti effetto biologico maggiore, creando codoni di stop, e risultano meno frequenti degli altri tipi di SNP.¹⁹²

Il numero totale degli SNP esistenti risulta difficilmente quantificabile con precisione, secondo alcune stime ci sono 3 milioni di SNP nell'uomo, secondo altre il numero salirebbe a 10 milioni.¹⁸⁹⁻¹⁹³

Gli SNP possono trovarsi in qualunque zona del DNA, alcuni si trovano all'interno di geni, negli introni, negli esoni, o nelle sequenze regolatrici, altri si trovano (e sono la maggioranza) in zone del genoma all'esterno di geni. Di conseguenza non tutti gli SNP danno origine ad una differenza fenotipica rilevabile, o perché non si trovano all'interno di un gene, o perché entrambe le sue versioni danno origine allo stesso prodotto proteico. Gli SNP ubicati fuori dalle sequenze codificanti del DNA vengono definiti silenti, ma questo non implica che siano senza significato biologico, è infatti dimostrato che SNP localizzati in zone regolatrici del DNA, come quelli localizzati nel promotore dei geni, possono modificare l'affinità di legame dei fattori di trascrizione di quel gene, dimostrando quindi di avere comunque un effetto funzionale.¹⁹³ Gli SNP ubicati all'interno di zone che codificano per proteine possono essere classificati in tre gruppi: SNP sinonimi, missenso e non senso. I primi sono tali in quanto i diversi alleli codificano comunque per lo stesso amminoacido, nei secondi la variazione di un nucleotide ha generato la codifica per un amminoacido diverso e quindi la sequenza peptidica sarà diversa. Nei polimorfismi non senso si crea invece una variante che codifica per un codone di stop.¹⁹⁴ È anche possibile che l'effetto di un polimorfismo sia quello di eliminare un codone di stop esistente, potendo dare quindi vita a trascritti più lunghi del normale. I polimorfismi appartenenti alle ultime due tipologie (missenso e non senso), possono anche essere complessivamente indicati come “SNP non sinonimi”.¹⁹²

I polimorfismi possono anche essere classificati come funzionali, quando causano una differenza rilevabile fenotipicamente, oppure come neutrali, quando sono biologicamente inerti.¹⁹⁰

La scoperta degli SNP nell'uomo è iniziata con il sequenziamento parziale ed il confronto dei genomi di soli 48 individui, cosa che ha portato alla scoperta di più di un milione di SNP. È oggi possibile determinare la presenza simultanea di molti polimorfismi (composizione allelica) in un individuo, tramite microarray di DNA.¹⁹⁴

I polimorfismi, essendo ereditabili e comunemente presenti nella popolazione, possono essere utilizzati con vari scopi, come accade in medicina legale o nello studio delle migrazioni di popolazioni differenti. Possono anche essere utilizzati come markers noti nel DNA, per l'individuazione in famiglie colpite da malattie genetiche del locus dove più probabilmente risiede il gene responsabile del quadro clinico (clonaggio posizionale). Gli SNP in particolare essendo distribuiti su tutto il genoma, se presenti in posizioni note, tenderanno a segregare congiuntamente ai geni responsabili della malattia negli individui affetti, nelle varie generazioni, a patto che siano situati abbastanza vicino ai geni in questione. Gli SNP possono anche essere usati per scoprire geni di suscettibilità per varie patologie multifattoriali, con predisposizione genetica complessa, con la mappatura per associazione. Avendo infatti a disposizione mappe dettagliate di SNP che coprono l'intero genoma, è possibile allestire studi di GWA (Genome Wide Association – associazione sull'intero genoma) che confrontano migliaia di individui affetti con migliaia di controlli sani: il carattere in esame risulterà in associazione più stretta con gli SNP localizzati nei geni che lo influenzano, piuttosto che con gli SNP localizzati in altri geni. Nell'ambito di patologie multifattoriali i polimorfismi così rilevati, in genere, costituiscono solo una piccola parte del rischio genetico per quella patologia, che per verificarsi necessita di più fattori di rischio genetici ed ambientali. Si tratta comunque di una evidenza statistica, dato che gli SNP così evidenziati potrebbero solo essere espressione di linkage-disequilibrium ed essere un marker di un difetto molecolare in un locus situato nella loro prossimità e non la causa della malattia, per cui dai risultati di questo tipo di studi vanno poi distinti gli SNP aventi anche un significato funzionale.¹⁹³

La prova formale dell'associazione tra polimorfismo di un gene e rischio per una determinata patologia, richiede la caratterizzazione molecolare del gene e dei suoi differenti alleli. Grazie agli studi di GWA si sono identificati almeno 300 geni di rischio, per 70 patologie umane, tra cui neoplasie, malattie cardiovascolari ed autoimmuni, il numero è in costante crescita.¹⁹⁵

Grazie a questi studi, utilizzando gli SNP come markers che coprono l'intero genoma, è anche possibile analizzare la perdita dell'eterozigosi in alcuni geni o l'aumento del numero di copie di altri in molte neoplasie, compreso il melanoma. Questo può portare in un prossimo futuro alla scoperta di nuovi geni implicati nello sviluppo della patologia e nella sua progressione.¹⁹⁶

La conoscenza della patogenesi molecolare e delle interazioni tra le differenti vie di segnalazione presenti in molte patologie, come le neoplasie o il diabete mellito, ha permesso in tempi recenti di concentrare l'attenzione anche su polimorfismi a singolo nucleotide localizzati in siti di interazione tra diverse proteine, che possono modificare l'attività di queste molecole e dei pathways di segnalazione a cui prendono parte.¹⁹⁷

Gli studi di GWA infatti possono avere il pregio di essere privi di ipotesi a priori, ma richiedono una grandissima mole di dati e come già espresso non sempre i polimorfismi associati alle varie condizioni, ne sono poi la causa. Conoscendo invece le probabili basi genetiche delle patologie da studiare, è possibile analizzare selettivamente i polimorfismi dei geni candidati, per ritrovare il maggior numero di associazioni dirette e fisiologicamente rilevanti, su vie molecolari di importanza clinica.^{190,191} I polimorfismi a singolo nucleotide più frequentemente implicati nella modifica dei rapporti proteina-proteina e quindi nella potenziale modificazione dell'attività di svariati pathways di segnalazione, sono soprattutto nsSNP (non-synonymous SNP, polimorfismi non sinonimi, che modificano la sequenza amminoacidica dei peptidi). Questi sono stati associati soprattutto con patologie dalla genetica complessa, come neoplasie, autismo o diabete; si ritiene che questi polimorfismi agiscano modificando i siti di legame tra le diverse proteine, alterando la loro interazione, o al contrario conferendo una maggior stabilità al legame. Aumentando la stabilità di legame si crea il presupposto perché interazioni proteina-proteina, che fisiologicamente sono transitorie, diventino più durature. In generale è possibile affermare che tali SNP possono esibire un effetto di indebolimento oppure di rafforzamento dell'interazione tra proteine diverse, potendo dunque conservare o distruggere il sito di interazione tra due diverse molecole e quindi avere un effetto finale nocivo, indifferente o vantaggioso.¹⁹⁷

Analizzando l'effetto degli SNP sulle singole proteine si nota la possibilità, per polimorfismi che agiscono su sequenze codificanti, di modificare anche la stabilità del prodotto proteico in sé. Questo può condurre a una diminuzione dell'attività enzimatica se la proteina colpita è un enzima; è parimenti possibile la creazione, su proteine inserite in determinati pathways di segnalazione, di nuovi siti di fosforilazione. Dato che la fosforilazione è uno degli elementi principali della trasduzione del segnale, questi polimorfismi possono causare differenti risposte agli stimoli del microambiente cellulare.¹⁹³

Un recente studio ha analizzato l'impatto nelle patologie umane dei polimorfismi a singolo nucleotide, suddividendoli in 9 categorie (nonsense, non sinonimi, sinonimi, SNP compresi nella regione 5'-UTR dell'mRNA, SNP che incidono sulla regione 3'-UTR dell'mRNA, SNP in regioni vicine al 5' o al 3' UTR dell'mRNA, SNP presenti in introni, SNP in regioni extrageniche del DNA), ed analizzando l'associazione di queste tipologie di polimorfismi con

molte patologie umane, i risultati hanno dimostrato che non solo i nsSNP (modificando le sequenze peptidiche) sono importanti nel conferire un rischio per molte patologie multifattoriali, ma andrebbero investigati anche altri tipi di polimorfismi, compresi i polimorfismi sinonimi nelle regioni situate al 3'-UTR. Questi infatti risultano associati a diverse patologie umane ed è ipotizzabile che tutto ciò non sia solo casuale o frutto del linkage-disequilibrium, ma sia anche dovuto al fatto che in queste regioni (nella sequenza del trascritto di mRNA) esistono ad esempio molti siti di legame per micro-RNA ad azione regolatrice, che potrebbero dunque subire delle modificazioni funzionali in larga misura ancora inesplorate.¹⁹⁸

Nello studio della predisposizione genetica allo sviluppo delle neoplasie è possibile distinguere modelli di suscettibilità che si basano sulle classiche leggi mendeliane. Questi fanno capo a più di 20 sindromi, che comportano un alto rischio di sviluppo di neoplasia per gli individui colpiti, comprendendo sindromi neoplastiche ereditarie, con mutazioni ad alta penetranza. Queste sindromi si rendono responsabili approssimativamente dell'1% delle neoplasie e sono causate da mutazioni della linea germinale, presenti in ogni cellula dell'individuo. I geni colpiti si ereditano spesso con modalità dominante e le mutazioni più frequentemente rilevate sono inattivanti ed a carico di geni oncosoppressori. In questo caso la condizione necessaria per lo sviluppo della neoplasia è la perdita del secondo allele non colpito da mutazione germinale (ipotesi del “doppio colpo” di Knudson). Le sindromi neoplastiche ereditarie con mutazioni germinali su oncogeni sono invece più rare ed in questo caso non è necessaria la mutazione del secondo allele. Sia che la mutazione germinale coinvolga oncogeni od oncosoppressori, per lo sviluppo di una neoplasia sono necessarie altre mutazioni somatiche.¹⁹⁹

La grande maggioranza delle neoplasie non insorge però nell'ambito di sindromi ereditarie. In questo caso il rischio genetico per lo sviluppo della neoplasia, patologia multifattoriale, è dato per lo più da varianti genetiche comuni nella popolazione, come sono ad esempio gli SNP. Questi conferiscono singolarmente un basso rischio (tipicamente comportano un rischio relativo di 1,1–1,3 per allele), ma essendo varianti comuni nella popolazione generale, possono sommarsi nel singolo individuo, con effetto additivo. Spesso influenzano l'espressione genica, ed anche se i geni interessati dagli SNP nel cancro hanno funzioni molto varie, alcune vie molecolari possono essere più interessate di altre. In alcuni casi sono possibili anche associazioni clinico-patologiche tra SNP e sede di insorgenza della neoplasia, stadio, o grado. Molti SNP conferiscono una predisposizione organo-specifica allo sviluppo di neoplasie, altri possono comportare un rischio aumentato per l'insorgenza di numerose neoplasie. Il polimorfismo SNP

rs6983267 ad esempio, comporta un aumentato rischio per l'insorgenza di carcinomi del colon-retto, della prostata e dell'ovaio.²⁰⁰

Alcuni SNP possono anche interagire in maniera complessa con il substrato genetico responsabile delle sindromi neoplastiche ad ereditarietà mendeliana, agendo come geni modificatori del rischio di insorgenza di neoplasia, aumentando o diminuendo la penetranza all'interno dei gruppi familiari interessati.²⁰¹

Per quanto riguarda il melanoma, i polimorfismi genetici sono compresi soprattutto nelle mutazioni genetiche a bassa penetranza che predispongono all'insorgenza della neoplasia. Le modificazioni genetiche classicamente conosciute (ad alta penetranza, con ereditarietà mendeliana, come ad esempio la mutazione germinale di CDKN2A) per quanto riguarda la predisposizione allo sviluppo della malattia spiegano infatti solo il 40% dei casi familiari di melanoma, lasciando campo ad altri fattori genetici che possono influenzare il rischio di sviluppare la malattia, soprattutto quelli a bassa penetranza. Questi geni sono stati identificati grazie all'utilizzo di studi GWA e di metanalisi, gli unici sistemi che garantiscono la potenza statistica necessaria per individuarli. Gli studi GWA consentono di individuare anche mutazioni predisponenti a bassa penetranza che non risiedono nelle regioni codificanti del DNA.⁵⁷

Una sintesi dei polimorfismi genetici individuati tramite questi studi è presentato qui di seguito:

Gene/polimorfismo	rs	Studio	Ruolo identificato
MC1R - V60L	1805005	Williams P.F. et al, 2011	rischio insorgenza
MC1R - D84E	1805006	Williams P.F. et al, 2011	rischio insorgenza
MC1R - V92M	2228479	Williams P.F. et al, 2011	rischio insorgenza
MC1R - R142H	11547464	Williams P.F. et al, 2011	rischio insorgenza
MC1R - R151C	1805007	Williams P.F. et al, 2011	rischio insorgenza
MC1R - I155T	1110400	Williams P.F. et al, 2011	rischio insorgenza
MC1R - R160W	1805008	Williams P.F. et al, 2011	rischio insorgenza
MC1R - R163Q	885479	Williams P.F. et al, 2011	rischio insorgenza
MC1R - D294H	1805009	Williams P.F. et al, 2011	rischio insorgenza
MITF - E318K	149617956	Bertolotto C. et al., 2011	rischio insorgenza
SLC45A2	16891982	Ibarrola M. et al., 2012	rischio insorgenza
ASIP - haplotype G;T	1015362/4911414	Gudbjartsson DF et al, 2008	rischio insorgenza
ASIP - haplotype G;G	910873/1885120	Brown K.M. et al., 2008	rischio insorgenza
TYR - R402Q	1126809	Lill C.M. et al., 2011	rischio insorgenza
XPD - K751Q	1052559	Mocellin S. et al., 2009	rischio insorgenza
XPG - D1104H	17655	Gonçalves F.T., 2010	rischio ridotto
XPC - K939Q	2228001	Gonçalves F.T., 2011	rischio insorgenza
MGMT	12917/2308320	Gu F. et al., 2009	rischio insorgenza

MYO7A	2276288	Fernandez L.P. et al, 2009	rischio insorgenza in pazienti CDKN2A mutati
EDNRB	variante S305N	Spica T. et al., 2011	
CYP2D6	allele CYP2D6*4	Strange R.C. et al., 1999	rischio ins., spessore
LAPTM4B	allele LAPTM4B*2	Meng Z. et al., 2014	rischio insorgenza
MTAP	rs10757257	Kvaskoff M. et al., 2011	rischio insorgenza
VDR FokI, TaqI	s2228570 / rs731236	Zeljic K. Et al, 2014	rischio insorgenza
XPE	28720291	Chunying L. et al., 2013	sopravvivenza ridotta
ERCC5	4150314	Chunying L. et al., 2013	sopravvivenza ridotta
ERCC2	50871	Chunying L. et al., 2013	sopravvivenza ridotta
CR DNAMitocondriale	A16183C, T16189C, ecc...	Ebner S. et al., 2011	rischio insorgenza
CDK10	1805005	Stefanaki I. et al., 2013	rischio insorgenza
CLPTM1L	401681	Stefanaki I. et al., 2013	rischio insorgenza
DUSP14	1051849	Hongliang L. et al., 2013	rischio ridotto
MAFF/PLA2G6	4608623	Hongliang L. et al., 2013	rischio ridotto
GSTP1	1695	Ibarrola M. et al., 2012	rischio insorgenza
GNAS1	T393C	Frey U.H. et al., 2010	comparsa di metastasi
NOS1	2682826	Ibarrola M. et al., 2011	rischio ridotto
MMP1	G1607	Ye S. et al., 2001	invasività aumentata
IL10	aplotipo ATA	Meri-Sisko V., 2007	rischio insorg., > sopravv.
IL10	aplotipo ITAGC	Schoof N. et al., 2009	rischio ridotto
type 1 IFN genes	10964862	Lenci R.E. et al., 2012	sopravvivenza ridotta
type 1 IFN genes	10964859	Lenci R.E. et al., 2012	sopravvivenza ridotta
PDGFR	2220377	Park J.I. et al., 2013	sopravvivenza ridotta
KIT	5 polimorfismi rari	Bourillon A. et al., 2012	rischio insorgenza
MDM2	2279744	Firoz E.F. et al., 2009	rischio insorgenza in F
CDKN2A	polimorfismo A148T	Debniak T. et al., 2005	rischio insorgenza
OPT promoter	11730582	Schultz J. et al., 2009	non confermato
PARP1	3219125	Law M.H. et al., 2012	rischio insorgenza

I geni interessati appartengono a diverse classi funzionali, quali geni inerenti il metabolismo, la riparazione del DNA, la risposta a carcinogeni ambientali comprese le radiazioni UV, la risposta immunitaria, la pigmentazione ed il numero dei nevi melanocitici, possedendo tutti un ruolo nella genesi del melanoma. L'insieme di questi alleli comuni nella popolazione può contribuire a spiegare una parte della grande diversità inter-individuale per quanto riguarda il rischio di insorgenza di questa patologia.

I polimorfismi dei geni che condizionano la risposta immunitaria riguardano soprattutto i geni dell'IL-10 ed delle catene dell'interferone. I polimorfismi che agiscono sui geni che influenzano la pigmentazione umana, sono rappresentati soprattutto dalle varianti del gene MC1R (recettore

per la melanocortina) e dai polimorfismi presenti sui geni ASIP (Agouti Signaling Protein) e TYR (tirosinasi).⁴⁶

Ad oggi è possibile analizzare il ruolo di SNP presenti su intere vie di segnalazione di per se implicate nella patogenesi del melanoma, come ad esempio la via delle MAP-Kinasi. In essa risultano presenti numerosi SNP, identificati da studi GWA, molti dei quali si sospetta non abbiano però un effetto biologico diretto. Testare SNP già noti, disponibili in diversi database, su vie molecolari importanti nella patogenesi delle patologie in studio, è un approccio complementare agli studi GWA. Recentemente sono stati testati ad esempio 47.818 SNP in 280 geni appartenenti alla via delle MAP-Kinasi, su un campione di 1800 pazienti con melanoma e 1000 controlli sani. 105 SNP sono stati riscontrati con maggiore frequenza nei pazienti con melanoma e 26 di questi sembrano avere anche un ruolo funzionale. 16 di questi sono stati confermati anche da studi GenoMel (Consorzio internazionale di ricerca sulla genetica del melanoma, coordinato dall'università di Leeds). Tra questi, un SNP è stato riscontrato nel gene DUSP14 ed altri 15 SNP sono concentrati nella regione dei geni MAFF/PLA2G6. Il polimorfismo rs1051849 di DUSP14 è stato localizzato nella zona 3'UTR del gene, che nell'mRNA fornisce il sito di legame ai miRNA ad azione regolatrice. È stata quindi ipotizzata una sua attività funzionale ed il polimorfismo è risultato associato ad una riduzione del rischio di melanoma statisticamente significativa.²⁰²

I polimorfismi genetici possono quindi conferire una quota di rischio aggiuntivo per lo sviluppo di una patologia complessa e multifattoriale come il melanoma, ma in alcuni casi possono invece rivelarsi protettivi verso lo sviluppo della patologia. Si ritiene oggi che possano avere anche un'influenza sulla sopravvivenza del paziente. Per quanto riguarda il rischio di insorgenza possono interagire tra loro, se presenti nello stesso individuo, o modificare il rischio di insorgenza del melanoma conferito da altre mutazioni predisponenti, comprese le classiche ad alta penetranza (esempio CDKN2A) presenti nei gruppi di pazienti con melanoma familiare. Nel melanoma possono esistere anche polimorfismi localizzati sugli stessi geni che sono colpiti dalle classiche mutazioni ad alta penetranza. Il polimorfismo A148T di CDKN2A infatti, conferisce un rischio di malattia inferiore rispetto alla classica mutazione ad alta penetranza. Questo polimorfismo è riscontrabile nel 2,9% della popolazione polacca ed uno studio ha dimostrato che in queste regioni, il 7% dei pazienti colpiti da melanoma maligno (sia con anamnesi familiare positiva, che negativa) è portatore di questo polimorfismo non sinonimo, che conferisce quindi un rischio significativo di sviluppare melanoma (odds ratio = 3,4; p = 0,0002) soprattutto nei pazienti con meno di 50anni.²⁰³

Risultati simili sono stati riscontrati in Brasile, dove la presenza dello stesso polimorfismo correlava con l'aumento del rischio di insorgenza di melanoma, ma non con altri parametri istologici. Importante è sottolineare che la popolazione brasiliana portatrice del polimorfismo, risulta direttamente discendente da famiglie di origine centro-europea e viene anche riportata una maggiore incidenza di altre neoplasie nella storia familiare di questi pazienti.²⁰⁴

La valutazione della presenza della variante A148T nella popolazione italiana ha conseguito esito negativ.²⁰⁵

Tutto questo è esemplificativo di come questi determinanti genetici di rischio possano spostarsi con le popolazioni ed essere presenti o meno in pazienti di diversa origine etnica. Dati non ancora confermati sostengono la presenza di polimorfismi, che conferiscono un rischio maggiore di insorgenza di melanoma, su molecole che spesso mutano (con mutazioni somatiche) durante la patogenesi del melanoma, come c-KIT.²⁰⁶

Per quanto riguarda i polimorfismi che possono condizionare una maggiore invasività del melanoma, è stato estesamente valutato il ruolo delle metalloproteasi. Nel gene codificante per la MMP1 (Matrix Metalloproteinase 1, metalloproteasi1) un SNP, che sostituisce un singolo nucleotide nel promotore del gene, è responsabile della formazione di un sito di legame aggiuntivo per il fattore di trascrizione che regola il gene, con trascrizione aumentata nelle cellule di melanoma dei pazienti portatori del polimorfismo e conseguente maggiore propensione alla fase di crescita verticale della neoplasia.²⁰⁷

La ricerca di polimorfismi genetici in altre MMP (MMP2, MMP3 e MMP9) ha dato invece esito negativo, pur avendo queste molecole un ruolo significativo nella progressione del melanoma.^{208,}
209

Per quanto riguarda il recettore della vitamina D, recenti studi hanno evidenziato una forte correlazione con il rischio di insorgenza di melanoma per i polimorfismi FokI e TaqI, con rischio presente in eterozigosi ed aumentato quando presenti in omozigosi. Non è stata confermata invece la presenza di altri polimorfismi del recettore della vitamina D riscontrati in studi differenti, quali EcoRV e ApaI, come determinanti di rischio genetico, almeno nella popolazione presa in esame, il che può essere dovuto a differenze etniche.⁵⁹

Per quanto riguarda i geni implicati nella riparazione del DNA, sono numerosi gli studi che identificano un ruolo dei polimorfismi genetici esistenti in queste importanti vie molecolari nel conferire un rischio per l'insorgenza del melanoma. I geni più interessati da questi polimorfismi sono PARP1 (Poly ADP-Ribose Polymerase 1), TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) ed il gene ATM. Ad esempio il polimorfismo SNP rs1800054 del gene ATM (Ataxia Telangiectasia

Mutated), fisiologicamente implicato nella riparazione del DNA, nell'induzione della senescenza cellulare e nell'apoptosi, comporta un aumento del rischio di insorgenza di melanoma.²¹⁰

Gli SNP presenti in PARP1, componente integrale del sistema di base-excision repair implicato nella rimozione di basi del DNA ossidate, contribuiscono all'aumento del rischio di insorgenza del melanoma. Anche polimorfismi dei geni XPE, ERCC5/XPG, XPC, ERCC2/XPD (che hanno funzioni simili al precedente), risultano coinvolti nell'incrementare il rischio di melanoma. La conferma biologica dell'associazione deriva dal fatto che questi geni sono frequentemente implicati nella riparazione del danno da UV. Alcuni di questi polimorfismi mostrano comunque espressione limitata nei pazienti con melanoma, interessando circa il 2% dei pazienti arruolati negli studi, altri sono invece più espressi, con frequenze che variano approssimativamente dal 20% al 60% dei pazienti esaminati. Per alcuni di questi SNP (esempio: ERCC/XPG, genotipo AG, ERCC/XPD, genotipo AA) è stato anche dimostrato un ruolo nel condizionare la prognosi del paziente con melanoma, con un aumento del rischio di morte per neoplasia nei pazienti portatori.⁸⁸

Il polimorfismo rs401681 localizzato in prossimità del gene di TERT, che codifica per una componente dell'enzima delle telomerasi, esita in una minore attività enzimatica e sembra essere protettivo per lo sviluppo del melanoma. Il polimorfismo infatti facilita la senescenza cellulare mediante una più rapida perdita dei telomeri, attraverso l'attivazione del gene ATM. Lo stesso polimorfismo è risultato invece incrementare il rischio di incidenza di altre neoplasie in cui probabilmente sono attive altre vie molecolari, a dimostrazione che uno stesso polimorfismo genetico ereditario può agire in maniera differente a seconda del contesto.²¹⁰

Precedentemente gli stessi Autori avevano evidenziato che tale allele del gene TERT, è associato ad un minor numero di nevi melanocitici, per cui è ipotizzabile un effetto protettivo nei confronti dell'insorgenza del melanoma che inizia precocemente, a livello dello sviluppo di lesioni melanocitarie benigne.²¹¹ Alcuni Autori, in studi più recenti, hanno ipotizzato infatti che la riduzione della lunghezza dei telomeri possa essere uno dei segnali capaci di attivare i programmi cellulari di senescenza nei melanociti, comportando anche un effetto protettivo per l'insorgenza del melanoma. Nello stesso studio è stata anche dimostrata una associazione inversa tra lunghezza dei telomeri e rischio di melanoma, mentre in altri l'associazione non si è rivelata statisticamente significativa.²¹²

Altri lavori hanno recentemente documentato come alcuni polimorfismi SNP del gene POT1 (Protection of Telomeres 1), proteina nucleare coinvolta nel mantenimento dei telomeri, alterando la funzione della proteina, determinino un allungamento eccessivo dei telomeri e siano associati ad un aumentato rischio di sviluppo di melanoma cutaneo.^{213,214}

Un recente studio condotto sulla popolazione italiana e statunitense focalizzato su geni e polimorfismi implicati nel mantenimento dei telomeri, ha riscontrato che nella nostra popolazione è presente l'allele C del SNP rs2721173 (gene RECQL4, *DNA Helicase, RecQ-Like, Type 4*) che risulta associato ad un maggiore rischio di melanoma e che il polimorfismo SNP rs6011002 allele G (gene RTEL1, *Regulator Of Telomere Elongation Helicase 1*), correla con una maggiore presenza di nevi displastici nei pazienti. Nella casistica statunitense questi dati però non hanno trovato conferma, mostrando ancora come la presenza di polimorfismi considerabili fattori genetici di rischio a bassa penetranza per una determinata patologia, varia a seconda della popolazione presa in esame.²¹²

Li et al. afferma che polimorfismi situati sui geni del sistema NER (Nucleotide Excision Repair) correlano con la sopravvivenza dei pazienti con melanoma, in particolare nel paziente con melanoma di spessore intermedio o con metastasi linfonodali. I geni del sistema NER interessati sono soprattutto XPE, ERCC5, XPC e ERCC2, e gli SNP hanno dimostrato di correlare con la prognosi. Certamente l'effetto di ogni singolo polimorfismo, pur statisticamente significativo, è limitato, ma risulta tuttavia possibile suddividere i pazienti in diverse classi di rischio a seconda del numero di polimorfismi contemporaneamente presenti nel loro genoma. Infatti la sopravvivenza dei pazienti affetti da melanoma sembrerebbe peggiorare sensibilmente, fino a diminuire di ben 30 volte il valore iniziale, all'aumentare del numero di polimorfismi presenti, che mostrano tra di loro un effetto sinergico.²¹⁵

Questi risultati se confermati, ampliati ed uniti ai risultati di altri studi, potrebbero essere utili per stratificare meglio i pazienti con melanoma a seconda della prognosi e quindi scegliere l'opzione terapeutica più appropriata.

Per quanto riguarda i polimorfismi comportanti un aumentato rischio di malattia, sono in studio numerosi modelli di stima del rischio di sviluppare melanoma, che comprendono anche lo screening simultaneo per più polimorfismi comuni, assieme alla rilevazione dell'anamnesi familiare e delle caratteristiche fisiche del soggetto. Essendo il melanoma una patologia multifattoriale, un modello poligenico è infatti idealmente migliore nella predizione del rischio di malattia. Questi modelli hanno chiaramente dimostrato che l'effetto di ogni singolo polimorfismo è modesto, ma ad esempio considerando 11 polimorfismi simultaneamente, nei pazienti che presentano multipli alleli considerati a rischio, si assiste ad un aumento di 5 volte della probabilità di sviluppare melanoma. Un possibile punto di criticità di questi modelli predittivi, è che finora parte dei polimorfismi indagati correlavano anche con caratteristiche fisiche clinicamente rilevabili (ad esempio fototipo). Aggiungere la possibilità di indagare

polimorfismi che non correlano in alcun modo con caratteristiche fenotipiche dei soggetti testati, potrebbe aumentare di molto la performance dei modelli di rischio.²¹⁶

Secondo recenti dati sperimentali, il polimorfismo a singolo nucleotide 443T/C, presente in alcuni individui nel promotore del gene per l'osteopontina (OPN), potrebbe avere un ruolo importante nel favorire la progressione del melanoma. La variante 443C in omozigosi infatti, media una maggiore attivazione del gene, mediante il fattore di trascrizione c-myb.²¹⁷ Recenti studi hanno dimostrato a livello molecolare, come l'osteopontina promuova l'invasività nel melanoma ed è stato riscontrato un aumento dell'osteopontina nel siero di pazienti con melanoma in stadio avanzato.^{218, 219} I dati preliminari sull'esistenza del polimorfismo 443C nel promotore del gene OPN andrebbero confermati da ulteriori studi clinici volti a chiarire un eventuale legame di questo SNP con la prognosi del paziente con melanoma.

STUDIO SPERIMENTALE

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Oggetto dello studio è stata la ricerca di specifici polimorfismi genetici nei pazienti affetti da melanoma cutaneo afferenti la clinica Dermatologica dell'Ospedale Regionale di Ancona, con valutazione del ruolo degli stessi nel rischio di insorgenza della neoplasia.

Scopo secondario dello studio è stato quello di valutare l'impatto prognostico dei suddetti polimorfismi, esaminando inoltre la loro relazione con i principali aspetti isto-patologici della malattia.

Lo studio è stato strutturato nelle seguenti fasi:

1. Identificazione dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) da indagare sulla base di una approfondita analisi della letteratura scientifica esistente,
2. Arruolamento sequenziale dei pazienti, secondo partecipazione volontaria, con creazione di database mediante raccolta dei referti anatomo-patologici delle lesioni primitive asportate presso la Clinica di Dermatologia dell'Università Politecnica delle Marche dell'Ospedale Regionale di Ancona e inserimento nello stesso dei fattori prognostici istologici,
3. Arruolamento sequenziale dei controlli sani, in base a partecipazione volontaria e creazione di database,
4. Ricerca dei polimorfismi *rs2699887* del gene *PI3KCA* e *rs3730089* del gene *PIK3R1*, su campioni di sangue prelevati da entrambe le popolazioni prese in esame,
5. Stratificazione dei soggetti analizzati in base alla presenza o meno di omozigosi o eterozigosi per i polimorfismi in esame ed in base alle caratteristiche istologiche della neoplasia,
6. Confronto della frequenza dei polimorfismi genetici nella popolazione dei malati e nel gruppo controllo,
7. Confronto dei principali criteri istologici nel gruppo dei pazienti eterozigoti/omozigoti per i due SNP e nel gruppo dei pazienti non portatori di polimorfismi ("*pazienti wild-type*"),
8. Analisi statistica dei dati.

L'identificazione dei polimorfismi genetici costituenti un fattore di rischio costituzionale per l'insorgenza di melanoma o condizionanti la prognosi del paziente, potrebbe contribuire a chiarirne la patogenesi e a migliorare gli attuali modelli di stima del rischio di malattia e di progressione della stessa, attualmente basati rispettivamente sulle caratteristiche anamnestiche e fenotipiche del soggetto e su quelle istologiche della neoplasia.

La caratterizzazione di questi polimorfismi potrebbe concorrere all'apertura di nuovi scenari per future terapie a bersaglio molecolare ed alla pianificazione di campagne di screening mirate a popolazioni aventi maggior rischio di insorgenza della neoplasia.

MATERIALI E METODI

Selezione dei polimorfismi SNP

I polimorfismi SNP testati sono coinvolti nella via di segnalazione intracellulare della fosfatidilinositolo-3-kinasi (PI3K) implicata nella progressione del melanoma e di altre neoplasie come ampiamente dimostrato in letteratura. I polimorfismi sono stati selezionati, dopo una revisione della letteratura esistente, sulla base degli studi di L.Li et al. (2008) e di Q.Li et al. (2013).^{11,12}

Il primo studio clinico caso-controllo ha indagato il polimorfismo rs3730089 del gene PIK3R1, variante Met326Ile, che codifica per la subunità regolatrice p85 α della PI3K. È noto che circa 1/3 dei carcinomi del colon presentano l'attivazione della via della PI3K, grazie soprattutto a mutazioni attivanti la subunità catalitica p110 della PI3K.¹¹

La subunità regolatrice p85 α è invece deputata al legame del dominio citoplasmatico dei recettori tirosin kinasici per fattori di crescita, evento essenziale che porta all'attivazione della subunità catalitica dell'enzima e quindi della via di segnalazione intracellulare.⁹⁶

Nello studio di Li et al. sono stati inclusi 421 pazienti affetti da carcinoma del colon e 483 controlli sani; la presenza del polimorfismo Met326Ile della subunità p85 α (consistente nella sostituzione in posizione 326 della sequenza peptidica di p85 α di un amminoacido metionina con un amminoacido isoleucina) si associava ad un aumento del rischio di insorgenza di carcinoma del colon, indipendentemente dalla presenza di altri fattori di rischio (età, sesso, storia familiare, attività fisica, BMI, alcool, fumo) e fattori protettivi noti per la patologia (FANS). La presenza del polimorfismo comportava un odds ratio di 1.73 (95% IC, 1.24-2.42, P = 0.001) in favore dello sviluppo di neoplasia e l'effetto risultava ancora più marcato nei pazienti con età

>64 anni (OR = 2.10), con un aumento additivo del rischio a seconda della presenza in omozigosi del polimorfismo, piuttosto che in eterozigosi (OR = 2.27, 95% CI 0.98-5.29, P = 0.001 per i soggetti omozigoti). Il merito di questo studio è anche quello di aver dimostrato per primo una relazione tra polimorfismi ereditari del gene PIK3R1 e rischio di neoplasie.¹¹

Il secondo studio selezionato ha indagato in pazienti affetti da carcinoma polmonare non a piccole cellule, polimorfismi SNP di geni implicati nella via della PI3K, notoriamente coinvolta nella proliferazione cellulare, e nella invasità e progressione neoplastica. Essendo la metastatizzazione cerebrale un evento relativamente frequente in corso di neoplasia polmonare, Li e collaboratori hanno ricercato l'esistenza di polimorfismi nei geni codificanti per componenti della via della PI3K associati ad un aumentato rischio di localizzazione secondaria di malattia a livello del sistema nervoso centrale. I geni presi in considerazione sono stati PI3KCA (subunità catalitica p-110 α dell'enzima), PTEN (oncosoppressore mutato in molte neoplasie avanzate, che codifica per una fosfatasi che defosforilando il fosfatidil-inositolo trifosfato, regola negativamente il segnale della via della PI3K), AKT1 (protein-kinasi attivata specificatamente dalla via della PI3K che media vari segnali tra cui l'inibizione dell'apoptosi, fosforilando ed inattivando vari substrati molecolari importanti in questo processo), AKT2 (implicata nella fosforilazione di più di 100 substrati intracellulari che regolano la proliferazione e crescita cellulare, inibizione dell'apoptosi ed angiogenesi) e FRAP1 (gene che codifica per mTOR, serin/treonin protein-kinasi considerata uno dei regolatori cardine del metabolismo cellulare, della crescita e della sopravvivenza della cellula in risposta ad ormoni e fattori di crescita, elementi nutritivi e fattori di stress; mTOR regola in maniera diretta ed indiretta, la fosforilazione di più di 800 proteine).^{12, 213}

Sono stati arruolati nello studio 317 pazienti affetti da neoplasia polmonare non a piccole cellule, che sono stati tipizzati per la presenza di 16 SNP coinvolgenti i geni sopra menzionati, valutando quindi la loro associazione con lo sviluppo o meno di metastasi interessanti il sistema nervoso centrale. Dei 16 SNP, 3 sono risultati statisticamente associati allo sviluppo di metastasi cerebrali al follow-up a due anni: la variante GT/GG di AKT1: rs2498804, la variante CT/TT di AKT1: rs2494732 e la variante AG/AA di PI3KCA: rs2699887. I rispettivi HR (*Hazard Ratio*) erano 1.860 (95% IC 1.199 – 2.885, P=0.006); 1.902, (95% IC 1.259–2.875, P = 0.002), e 1.933 (95% IC 1.168 – 3.200, P = 0.010). È stato anche riscontrato un effetto cumulativo statisticamente significativo tra i diversi polimorfismi, con il rischio di metastatizzazione che incrementa al sommarsi dei genotipi sfavorevoli.^{11,12}

In base al risultato di questi studi, i soggetti facenti parte del gruppo dei pazienti con melanoma, e quelli facenti parte dei controlli sani, sono stati tipizzati per due SNP che ricoprono un ruolo rilevante nella via della PI3K, cioè il polimorfismo rs3730089 del gene PIK3R1 (codificante per la sub unità p85 α della PI3K) e rs2699887 del gene PI3KCA (codificante per la sub unità catalitica p110 α della PI3K). È noto ad oggi che nel melanoma l'iperattivazione della proteinkinasi AKT (protein kinasi B, attivata dalla via della PI3K) è presente nell'80% dei casi e che la subunità catalitica della PI3K è iperattiva almeno nel 9% dei casi. Inoltre PTEN (regolatore negativo della kinasi AKT e della via della PI3K) è mutato o inattivato nel 50% dei casi. Attualmente pochi studi hanno indagato lo status della subunità regolatrice p-85 α , considerata da alcuni Autori come un nuovo oncogene, ancora oggi scarsamente caratterizzata.^{11,12,96}

Selezione dei partecipanti allo studio

Hanno preso parte allo studio pazienti con diagnosi istologicamente confermata di melanoma cutaneo, giunti all'osservazione della Clinica di Dermatologia, Ospedali Riuniti di Ancona nel periodo compreso tra il gennaio 2014 ed ottobre 2014, in quanto o sottoposti in tale periodo a diagnosi e biopsia escissionale della lesione o sottoposti a follow-up dermatologico in seguito a progressa diagnosi di melanoma cutaneo. L'escissione semplice e l'analisi anatomo-patologica del tumore primitivo sono state eseguite nel periodo che va dall'ottobre 2014, a luglio 2015. Gli esami anatomo-patologici sono stati eseguiti presso l'Istituto di Anatomia Patologica dell'Ospedale Regionale di Ancona. Nella fase preliminare a tutti i pazienti è stato richiesto il consenso informato per la realizzazione di test genetici finalizzati alla ricerca dei due polimorfismi SNP selezionati. I controlli sani sono stati reclutati in base a partecipazione volontaria. Nell'ambito dello studio sono stati arruolati 51 pazienti, e 139 controlli sani.

Raccolta dei dati

Per ogni melanoma cutaneo analizzato sono stati presi in considerazione i seguenti parametri clinico-patologici, inseriti in un apposito database:

- 1- Spessore di Breslow,
- 2- Livello di invasione di Clark,
- 3- Indice mitotico (numero di mitosi x mm², o in alcuni casi, x 10hpf),
- 4- Tipo istologico,
- 5- Presenza di ulcerazione,

- 6- Presenza di invasione linfo-vascolare,
- 7- Presenza di neurotropismo,
- 8- Presenza di microsatellitosi,
- 9- Presenza di regressione,
- 10- Tipo di infiltrato infiammatorio (classificato come “brisk, non brisk“ o “assente“, oppure come intralesionale, perilesionale, sotto lesionale, focale, diffuso, intenso, scarso o assente),
- 11- Pattern di crescita,
- 12- Positività o negatività dei margini chirurgici.

Per ciascun paziente è stata anche annotata la sede di insorgenza del melanoma cutaneo e raccolta la documentazione istologica riguardante il successivo allargamento con l'eventuale esecuzione della metodica del linfonodo sentinella. Sono stati raccolti i referti istologici riguardanti le eventuali dissezioni linfonodali ed i dati riguardanti localizzazioni secondarie cutanee e non, inclusi i referti istologici di eventuali metastasectomie cutanee. Gli esami ematochimici eseguiti durante l'iter clinico dei pazienti (emoglobina espressa in g/dl, rapporto neutrofili/linfociti, valori di LDH in U/L, di fosfatasi alcalina in U/L, sodiemia in mEq/L) sono stati allegati alla documentazione di ciascun paziente.

Estrazione del DNA genomico

L'estrazione del DNA genomico dal sangue è stata realizzata con il *Kit “Flexigene 3 ml Blood”*, seguendo il protocollo fornito dal *kit* stesso.

In una *falcon* da 15 ml, etichettata col numero d'identificazione del paziente, venivano aliquotati 2 ml di sangue e 5 ml del *buffer* di lisi FG1.

Al campione, centrifugato per 5 min. a 2000xg, veniva scaricato il sovrnatante e aggiunto 1ml di buffer FG2 e 10µl di proteasi. La provetta, immediatamente agitata al *vortex* fino ad ottenere una soluzione omogenea, veniva posta in un *termo block* a 65° C per 10 minuti.

L'azione di digestione della proteasi veniva evidenziata mediante il viraggio del colore della miscela contenente il campione, da rosso a verde oliva. Successivamente veniva aggiunta alla miscela 1 ml di isopropanolo al 100%, miscelando per inversione, fino alla comparsa della “medusa” di DNA.

Il campione veniva centrifugato a 2000xg per 3 minuti e successivamente veniva scaricato il sovrnatante.

Infine il DNA veniva lavato con 1 ml di etanolo al 70 % e centrifugato a 2000xg per 3 minuti; eliminato il sovrantante, la *falcon* veniva capovolta su di un foglio di carta assorbente, per far evaporare tutto l'etanolo.

Successivamente il DNA veniva risospeso in 300 µl del *buffer* di eluizione FG3 (10 mM Tris-HCl, pH 8.5).

Reazione a catena della polimerasi (PCR) e tipizzazione dei campioni

La *Real Time PCR*, definita anche *PCR* quantitativa o *PCR* quantitativa in tempo reale (*rtq-PCR*), è una particolare reazione a catena della polimerasi (*PCR*), che permette la simultanea amplificazione e quantizzazione del DNA. (Fig.21)

Questa tecnica si basa sull'emissione di fluorescenza da parte delle sonde *TaqMan* presenti nella miscela di reazione. La sonda di tipo *Taqman* è un oligonucleotide marcato alle due estremità con due differenti fluorocromi: il *Reporter* all'estremità 5', che emette fluorescenza se colpito da un raggio luminoso, ed il *Quencer* all'estremità 3', che ha la capacità di inibire la fluorescenza dell'altra molecola fin quando entrambe si trovano sulla stessa sonda integra. Tale sonda è stata disegnata per essere complementare alla sequenza bersaglio del gene che deve essere amplificato e interna rispetto ai siti di legame della coppia di *primers*. Le fasi d'amplificazione sono le medesime della *PCR*:

- denaturazione;
- *annealing*;
- estensione del *primer*.

Durante la prima fase tutta la fluorescenza del *reporter* è assorbita dal *quencher*; nella seconda *primer* e le sonde s'appaiano alla sequenza d'interesse e nell'ultima la *Taq* Polimerasi estende il *primer*. Durante quest'ultimo stadio però, la *Taq* Polimerasi incontra la sonda ibridata, quindi, per portare a termine la copiatura del frammento, idrolizza la sonda utilizzando l'attività esonucleasica 5'-3'. Il risultato è che, per ogni copia di prodotto di *PCR* portata a termine, una sonda viene degradata. In questo modo, ogni volta che l'estremità 5' della sonda viene tagliata dalla polimerasi, il *Reporter* si libera in soluzione allontanandosi dal *Quencer*, generando un segnale fluorescente rilevabile dal *detector*. In base a questo meccanismo, l'intensità della fluorescenza emessa è direttamente proporzionale alla concentrazione della sequenza bersaglio. La tecnologia usata per il nostro studio è quella del *TaqMan SNP Genotyping Assay* (*Life Technologies*) che consiste in:

- Due primer per amplificare la sequenza di interesse;
- Due sonde *MGB TaqMan* per distinguere tra i due alleli: una sonda è marcata al 5' col *reporter dye* VIC che discrimina per l'allele1. L'altra è marcata al 5' col *reporter dye* FAM che discrimina per l'allele 2.

Pertanto, il segnale di fluorescenza generato mediante amplificazione PCR indica quali alleli sono presenti nel campione. Se viene rilevato solo il segnale del VIC il campione sarà omozigote per l'allele1, se viene individuata solo la fluorescenza emessa dal FAM il campione sarà omozigote per l'allele 2; se vengono riscontrati entrambi i segnali il campione sarà eterozigote. (Fig.6)

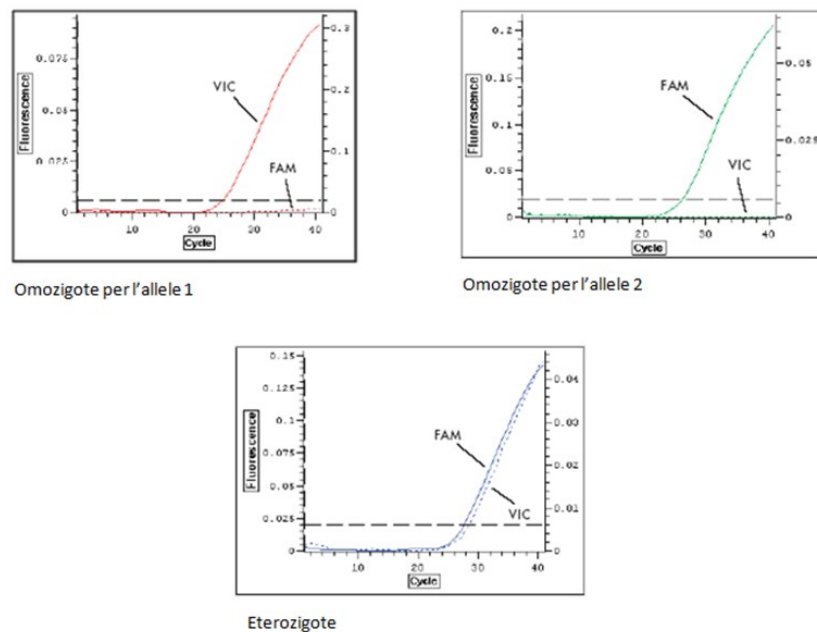


Figura 6: Interpretazione del risultato della real-time PCR.

La miscela di reazione comprende:

- 12.50 µl di *TaqMan Genotyping Master mix*
- 1.25 µl della sonda *TaqMan SNP Genotyping Assay* specifica per ogni SNPs studiato,
- 10.8 µl H₂O RNAsi free,
- 0.2 µl di campione,

per un volume finale di 25 µl.

La piastra di PCR costituita da 96 pozzetti viene inserita nel termocycler e vengono fissati i parametri termici:

- la Taq polimerasi viene attivata ad una temperatura di 95°C per 10 minuti,
- il DNA viene denaturato a 92°C per 15 secondi,
- la fase di *annealing*/estensione viene effettuata ad una temperatura di 60°C per un minuto.

Sono previsti 60 cicli di reazione.

Il rilevamento del segnale luminoso avviene ad opera dell'ABI PRISM 7300, che rileva la fluorescenza direttamente nei tubi di reazione. Lo strumento acquisisce lo spettro di emissione del campione per tutta la durata della reazione e converte la variazione di fluorescenza in una rappresentazione in tempo reale della cinetica di reazione.

Il dato di fluorescenza emesso dallo strumento è stato convertito in *output* grafico fluorescenza/ciclo di reazione che a sua volta viene analizzato da un algoritmo specifico che produce tre cluster allelici che rappresentano le componenti genotipiche: omozigote per l'allele1, omozigote per l'allele2 ed eterozigote. (Fig.7)(Fig.8)

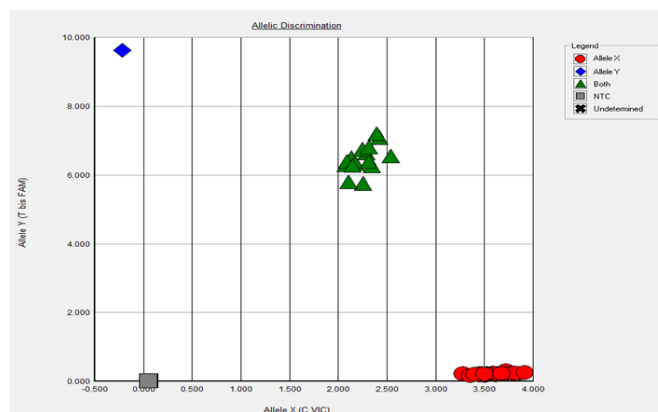


Figura 7: Rappresentazione dei cluster allelici per il polimorfismo rs2699887 del gene PI3KCA

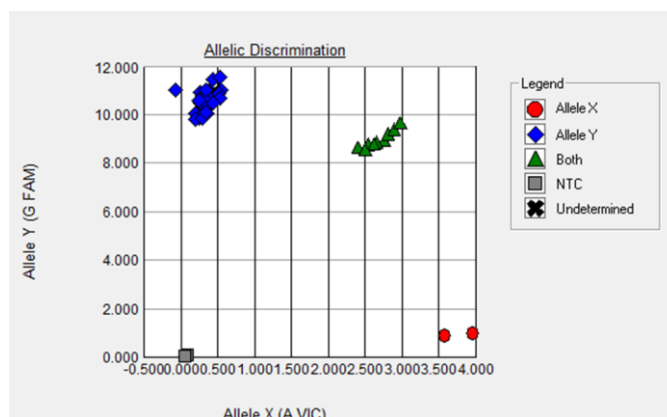


Figura 8: Rappresentazione dei cluster allelici per il polimorfismo rs3730089 del gene PI3KR

Analisi statistica dei dati

I dati ottenuti sono stati inseriti ed analizzati attraverso il programma statistico Med Calc (versione 15.2.1) ed un computer PC. Per ogni polimorfismo SNP preso in esame, sono state valutate le frequenze alleliche nella popolazione dei malati e nella popolazione di controllo, e sono stati calcolati gli odds-ratio.

Per ogni polimorfismo la correlazione con i parametri prognostici istologici raccolti nel database dei pazienti è stata valutata attraverso il coefficiente di correlazione di Pearson.

RISULTATI

Caratteristiche dei pazienti e dei controlli

Sono stati arruolati nello studio 51 pazienti, 30 di sesso maschile, e 21 di sesso femminile. L'età media dei soggetti alla diagnosi di melanoma, senza tener conto del sesso, era di 56,4 anni. Nelle donne l'età media si è rivelata inferiore (49 anni) mentre gli uomini presentano un'età media alla diagnosi più elevata (61 anni); il dato è in linea con i risultati di studi epidemiologici che rilevano un'età media alla diagnosi inferiore nel sesso femminile.²⁰

Gli estremi della casistica sono rappresentati da due pazienti (entrambi maschi) con età alla diagnosi di 81 anni e da una paziente con età di 26 anni al momento della diagnosi.

La localizzazione più comune di malattia è risultata essere l'arto superiore-inferiore (35% dei casi) con a seguire il dorso (33% dei casi), il torace (14% dei casi) ed il distretto testa-collo.

Per quanto riguarda il sesso maschile, il 67.8% delle lesioni risultava localizzato al distretto del tronco-torace, il 17.8% agli arti, il 10.8% al capo-collo, ed il 3.6% alle estremità; nel sesso femminile è stata rilevata ad una preponderanza delle lesioni localizzate agli arti (52.4%), con una discreta parte delle lesioni comunque localizzata al distretto tronco-torace (33.3%), segue la localizzazione al capo-collo (14.3%). Anche in questo caso il campione rispecchiava le caratteristiche epidemiologiche già note, come la maggiore presenza delle localizzazioni agli arti nel sesso femminile e la maggiore presenza delle localizzazioni al tronco-torace nel sesso maschile.²²²

Le localizzazioni al viso sono risultate più comuni soprattutto nei pazienti appartenenti alla 6°, 7° ed 8° decade, dati quindi conformi a quelli presenti in letteratura. Un solo paziente nel nostro database aveva anamnesi personale positiva per multipli melanomi ed un solo paziente aveva familiarità positiva per melanoma.

Per quanto riguarda lo spessore di Breslow, 16 melanomi erano lesioni intraepidermiche o in situ; tre melanomi intraepidermici mostravano all'esame istologico aspetti di regressione. Dei restanti, 23 erano melanomi sottili (con spessore inferiore ad 1 mm), dei quali 7 con fenomeni di regressione documentati istologicamente. I restanti 12 melanomi presentavano uno spessore di Breslow intermedio (1,1mm-3,9mm), solo un paziente presentava melanoma con spessore uguale a 4mm.

Per quanto riguarda il livello di invasione di Clark, il 34% dei pazienti presentava lesioni di livello I, il 16% di livello II, il 32% di livello III, il 18% di livello IV, non è stata osservata alcuna lesione di livello V. L'analisi statistica della distribuzione del livello di invasione di Clark per età mostra sostanzialmente distribuzioni paragonabili nei pazienti con età inferiore o maggiore-uguale a 60 anni, con una leggera prevalenza di lesioni di IV livello nel gruppo con età < 60 anni. Escluse le lesioni in situ, il 52% dei melanomi era istologicamente del tipo a diffusione superficiale (Superficial spreading), che quindi si conferma anche nel nostro campione come l'istotipo più frequente. Il melanoma nodulare costituiva il 6% delle lesioni. Stesso valore è stato rilevato per la lentigo maligna-melanoma. L'8% delle lesioni era costituita da istotipi più rari come il melanoma spitzoide ed il melanoma a cellule epitelioidi.

15 pazienti su 51 (29,4%) sono stati sottoposti, secondo indicazione clinica, alla metodica del linfonodo sentinella, riportando esito positivo in 3 casi (20% dei pazienti sottoposti alla metodica, dato concorde con quanto presente in letteratura.¹⁷² Il 35,3% dei linfonodi sentinella era localizzato alle stazioni ascellari destre, il 29,4% alle stazioni ascellari sinistre, il 17,6% alle

stazioni inguinali sinistre, l'11,8% alle stazioni inguinali destre, il 5,9% dei linfonodi sentinella era localizzato in altre sedi. I tre casi risultati positivi alla metodica erano localizzati alle stazioni linfonodali ascellari. Alla successiva dissezione linfonodale completa della stazione coinvolta 2 pazienti risultavano interessati da metastasi. Un solo paziente presentava metastasi cutanee in transit.

Per quanto riguarda i parametri prognostici istologici diversi dallo spessore e dal livello di invasione, 16 pazienti presentavano una conta mitotica positiva (31,4%), 5 pazienti presentavano ulcerazione (10%), l'invasione linfo-vascolare era presente solo in un caso, nessun paziente presentava lesioni con neurotropismo, o microsatellitosi, mentre la regressione era presente in 11 casi (21,6%). Il numero medio di mitosi nei pazienti positivi per tale parametro era di 3/mm². Due lesioni si discostavano sensibilmente dalla media riportando rispettivamente valori di 13 e 7 mitosi al mm². (Fig.9)

L'escissione chirurgica è stata eseguita ottenendo margini chirurgici negativi (R₀) in tutti i casi, e nessun paziente presentava esami ematochimici alterati in maniera significativa per i parametri considerati.

Il 62,7% delle lesioni presentava infiltrato infiammatorio documentato istologicamente, mentre il 37,3% delle lesioni non presentava infiltrato infiammatorio.

Il campione dei controlli sani era costituito da 139 soggetti di entrambi i sessi, in buono stato di salute, arruolati su base volontaria ed in maniera sequenziale durante il periodo di svolgimento dello studio.

CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI	
numero	51
SESSO	
M	30
F	21
età media di insorgenza di malattia	
M	61
F	49
numero di casi con:	
ULCERAZIONE	5
MITOSI	16
sede più frequente di insorgenza	
M	tronco-torace
F	arti

Figura 9: caratteristiche dei pazienti.

Polimorfismo SNP rs3730089 del gene PIK3R1 nel gruppo dei pazienti malati

In base ai risultati del test genetico, 9 pazienti sono risultati eterozigoti e 2 omozigoti per il polimorfismo rs3730089 del gene PIK3R1, codificante per la sub-unità regolatoria p85 α dell'enzima PI3K. I restanti pazienti sono risultati non portatori del polimorfismo analizzato. Considerando quindi il genotipo non mutato GG, posto che l'effetto dell'SNP rs3730089 sia la sostituzione del nucleotide G (guanosina) con un nucleotide A (adenosina), 9 pazienti sono portatori del genotipo GA (eterozigoti), e 2 pazienti sono portatori del genotipo AA (omozigoti). I restanti 40 pazienti, risultavano caratterizzati dal genotipo GG del gene PIK3R1, ovvero non interessati dal polimorfismo esaminato. (Tab.1) (Fig.10)

SNP rs3730089 gene PIK3R1	
Pz. GG	40
Pz. GA (eteroz.)	9
Pz. AA (omoz.)	2
Totale Pz.	51

Tabella 1: Risultati del test genetico gruppo pazienti per l'SNP della subunità p85

Polimorfismo SNP rs3730089 del gene PIK3R1 nei controlli sani

Nel gruppo di controllo, la tipizzazione per il polimorfismo rs3730089 ha fornito i seguenti risultati: 24 soggetti con genotipo GA (eterozigoti), 2 con genotipo AA (omozigoti) e 113 con genotipo GG (omozigoti non presentanti il polimorfismo in esame). (Tab.2) (Fig.11)

SNP rs3730089 gene PIK3R1	
Sogg. GG	113
Sogg. GA (eter.)	24
Sogg. AA (omo.)	2
Totale sani	139

Tabella 2: Risultati del test genetico nel gruppo controllo per l'SNP della subunità p85.

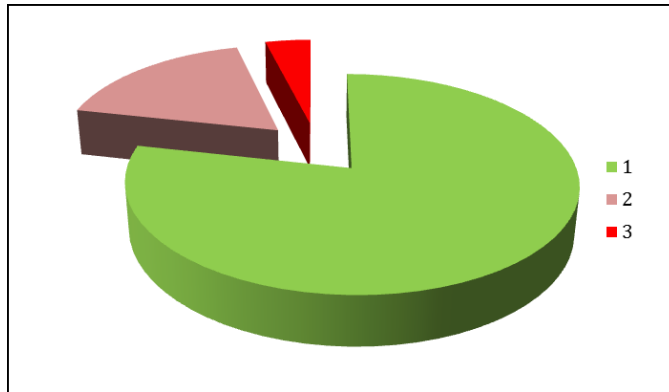


Figura 10: Rappresentazione grafica dei risultati nel gruppo dei malati, 1: genotipo GG, 2: genotipo GA, 3: genotipo AA.

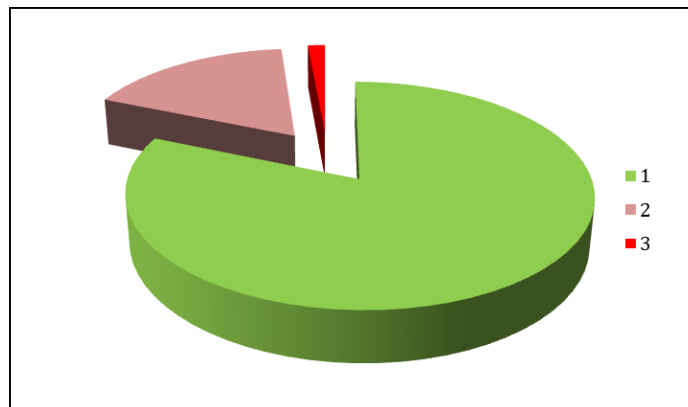


Figura 11: Rappresentazione grafica dei risultati nel gruppo di controllo, 1: genotipo GG, 2: genotipo GA, 3: genotipo AA.

Polimorfismo SNP rs3730089 del gene PIK3R1 e parametri prognostici istologici

Dei 5 melanomi caratterizzati da ulcerazione istologicamente accertata, 2 risultavano presenti in pazienti con genotipo GA/AA e 3 in pazienti con genotipo GG. (Fig.12)



Figura 12: Rappresentazione grafica dei risultati, 1: pazienti GA/AA con ulcerazione, 2: pazienti GG con ulcerazione.

Il numero totale dei melanomi con indice mitotico positivo risultava essere pari a 16, dei quali 3 riscontrati in pazienti di genotipo GA/AA e 13 in pazienti GG. (Fig.13)

Nei pazienti GA/AA emergeva uno spessore di Breslow medio pari a 0,25mm, mentre nei pazienti GG tale valore risultava pari a 0,7mm. Suddividendo i pazienti in due categorie, la prima comprendente i casi con spessore di Breslow inferiore ad 1mm e la seconda i casi con lesioni di spessore superiore o uguale ad 1mm, nella prima categoria il 23,3% delle lesioni è stato riscontrato in pazienti con genotipo GA/AA ed il 76,7% in pazienti non portatori di polimorfismo. Nella categoria di lesioni con spessore maggiore o uguale ad 1mm, non sono stati riscontrati pazienti con genotipo polimorfico (tutti i pazienti erano GG). (Fig.14) (Fig.15)



Figura 13: Rappresentazione grafica dei risultati, 1: pazienti GA/AA con conta mitotica positiva, 2: pazienti GG con conta mitotica positiva.

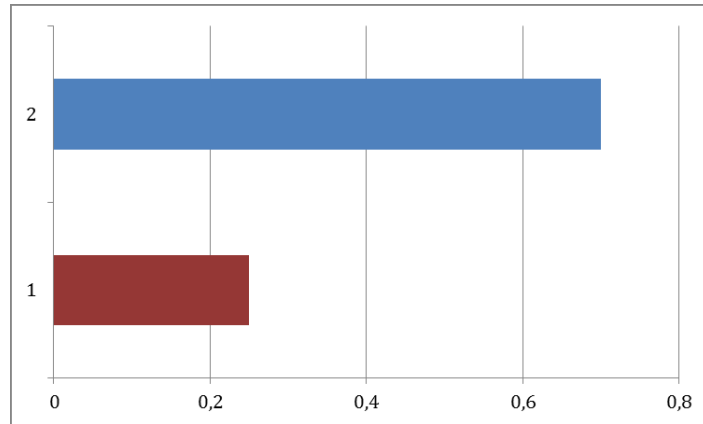


Figura 14: Rappresentazione grafica dei risultati, 1: spessore di Breslow medio delle lesioni nei pazienti GA/AA, 2: spessore di Breslow medio nei pazienti GG (non portatori del polimorfismo), il valore dello spessore di Breslow in mm, è riportato in ascissa.

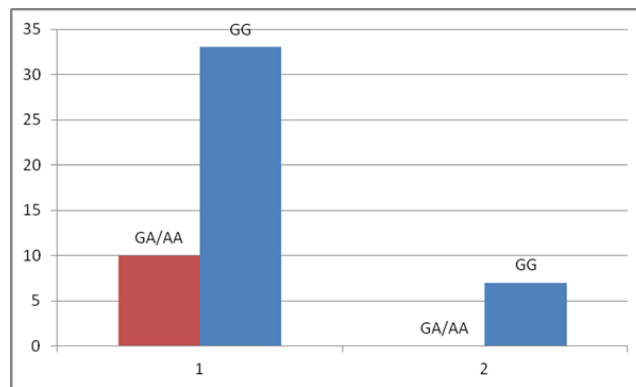


Figura 15: Rappresentazione grafica del numero di melanomi con Breslow < 1mm (prime due colonne) e del numero di melanomi con Breslow ≥ 1mm (ultime due colonne), in relazione al genotipo del paziente, nell'asse delle ordinate è presente il numero delle lesioni.

Per quanto riguarda il livello di invasione di Clark, per ogni livello di invasione si riscontrava una preponderanza dei pazienti negativi per l'SNP esaminato.

Per lesioni con primo livello di Clark (in situ) il 23,5% delle lesioni risultavano insorte in pazienti con genotipo GA/AA ed un 76,5% delle lesioni in quelli con genotipo GG.

Considerando le lesioni che raggiungevano il II livello di Clark, il 25% delle stesse insorgeva in pazienti con genotipo GA o AA, mentre il 75% in pazienti GG. Per il III livello, il 25% delle lesioni si presentava in pazienti GA/AA, mentre il 75% in pazienti GG. Tutte le lesioni che raggiungevano il IV livello di Clark, insorgevano in pazienti negativi per l'SNP testato. (Fig.16)

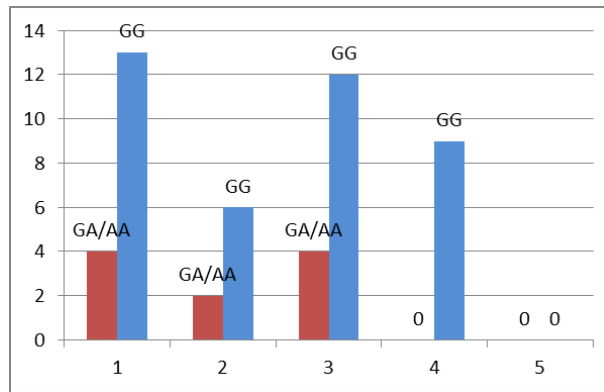


Figura 16: Rappresentazione grafica della stratificazione dei risultati a seconda del livello di invasione di Clark, in ascissa 1, 2, 3, 4, 5 rappresentano rispettivamente il I, II, III, IV e V livello di Clark, in ordinata è presente il numero delle lesioni.

Per quanto concerne lo stadio di malattia il 64% dei pazienti risultava compreso negli stadi 0 ed IA. Lo stadio più avanzato raggiunto dai pazienti della nostra casistica è risultato essere il III B. Per qualsiasi stadio di malattia considerato erano maggiormente rappresentati i pazienti non portatori di polimorfismo. I pazienti portatori del polimorfismo erano comunque concentrati nei primi tre stadi di malattia (0, IA ed IB). I pazienti GA/AA rappresentavano il 25% dei casi in stadio 0, il 18,8% dei pazienti in stadio IA ed il 27,3% di quelli in stadio IB. (Fig.17)

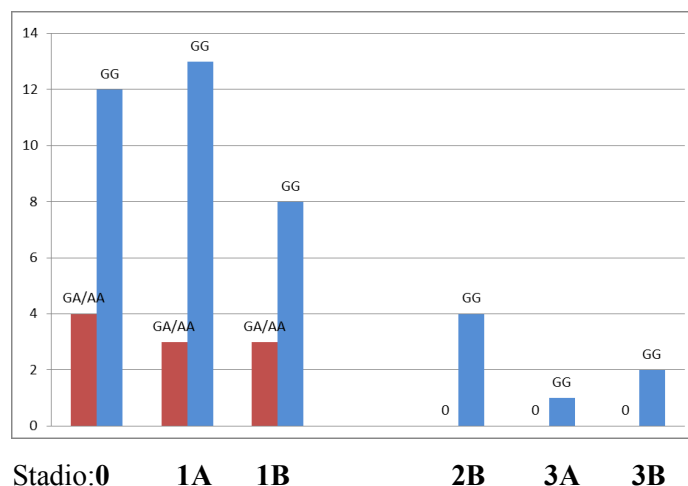


Figura 17: Rappresentazione grafica della distribuzione dei genotipi del polimorfismo rs3730089 del gene PIK3R1 codificante per la sub-unità p85α dell'enzima PI3K, a seconda dello stadio di malattia. GA/AA = pazienti eterozigoti od omozigoti per l'SNP, GG = pazienti non portatori. In ascissa è espresso lo stadio di malattia dei pazienti, in ordinata è possibile osservare il numero di lesioni, per i pazienti con storia di multiple lesioni primitive, è stata considerata la lesione in stadio più avanzato.

Per quanto riguarda la regressione istologicamente documentabile, su un totale di 11 pazienti che mostravano questo parametro, il 27,3% è risultato portatore del genotipo GA/AA, ed il 72,7% non risultava portatore dell'SNP per il gene della sub-unità p85α. (Fig.18)

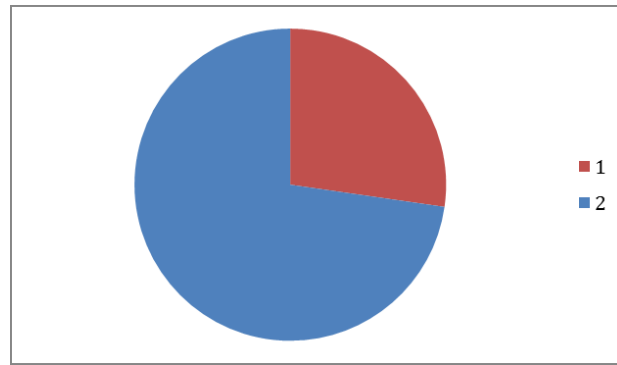


Figura 18: Rappresentazione grafica dei risultati: 1: pazienti con regressione documentata istologicamente, con genotipo GA/AA, 2: pazienti con regressione documentata istologicamente, con genotipo GG (non portatori del polimorfismo).

Il 15,6% dei pazienti che mostravano la presenza di infiltrato infiammatorio, è risultato portatore dell'SNP, mentre l'84,4% dei pazienti con infiltrato infiammatorio è apparso negativo per il polimorfismo al test genetico. (Fig.19)

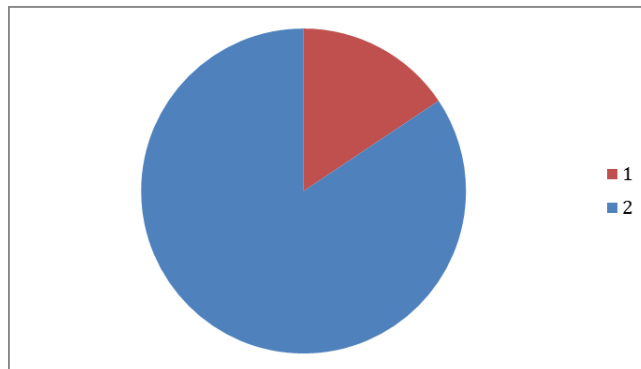


Figura 19: Rappresentazione grafica dei risultati, 1: pazienti con presenza di infiltrato infiammatorio istologicamente documentato con genotipo GA/AA, 2: pazienti con infiltrato infiammatorio con genotipo GG (non portatori del polimorfismo).

	SNP/Breslow	SNP/liv. Clark	SNP/mitosi	SNP/ulcerazione	SNP/inv. vascolare	SNP/regressione
Pearson r	-0,3871	-0,3932	-0,1654	-0,1667	Nd	-0,1667
95% I.C.	-0.8176 - 0.3208	-0.8199 - 0.3144	-0.7201 - 0.5183	-0.7208 to 0.5174	Nd	-0.7208 to 0.5174
P value	0,27	0,26	0,65	0,65	Nd	0,65

Tabella 3: Ricerca di associazione tramite coefficiente di correlazione di Pearson, tra la presenza o assenza del polimorfismo rs3730089 del gene PIK3R1 nei casi, ed i principali fattori prognostici istologici del melanoma, non è evidenziabile alcuna correlazione statisticamente significativa.

Polimorfismo SNP rs2699887 del gene PI3KCA nel gruppo dei malati

In base ai risultati del test genetico, 10 pazienti sono risultati eterozigoti e 2 omozigoti per il polimorfismo rs2699887 del gene PI3KCA, codificante per la sub-unità catalitica p110 α dell'enzima PI3K. I restanti pazienti sono risultati non portatori del polimorfismo analizzato.

Considerando quindi il genotipo non mutato CC (omozigote), posto che l'effetto dell'SNP è la sostituzione di un nucleotide citosina con un nucleotide timidina, 10 pazienti sono risultati portatori del genotipo CT (eterozigote) e 2 pazienti del genotipo TT (omozigote). I restanti 39 pazienti risultavano caratterizzati dal genotipo CC (omozigote) del gene PI3KCA, ovvero non portatori del polimorfismo esaminato. (Tab.4) (Fig.20)

SNP rs2699887 gene PI3KCA	
Pz. CC	39
Pz. CT (eteroz.)	10
Pz. TT (omoz.)	2
Totale Pz.	51

Tabella 4: Risultati del test genetico nel gruppo dei pazienti per l'SNP della subunità p110 α .

Polimorfismo SNP rs2699887 del gene PI3KCA nei controlli

Nel gruppo di controllo la tipizzazione per il polimorfismo rs2699887 ha dato i seguenti risultati: 46 soggetti sono risultati di genotipo CT (eterozigoti), 1 soggetto TT (omozigote) e 92 sono risultati CC (genotipo omozigote). (Tab.5) (Fig.36)

SNP rs2699887 gene PI3KCA	
Pz. CC	92
Pz. CT (eteroz.)	46
Pz. TT (omoz.)	1
Totale Pz.	139

Tabella 5: Risultati del test genetico nel gruppo di controllo per l'SNP della subunità p110 α .

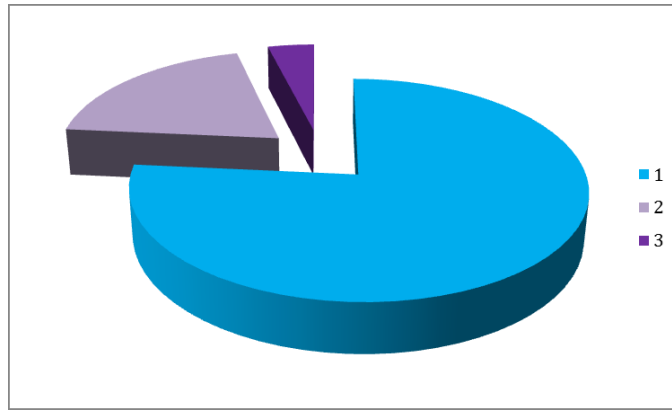


Figura 20: Rappresentazione grafica dei risultati nel gruppo dei malati, 1: genotipo CC, 2: genotipo CT, 3: genotipo TT.

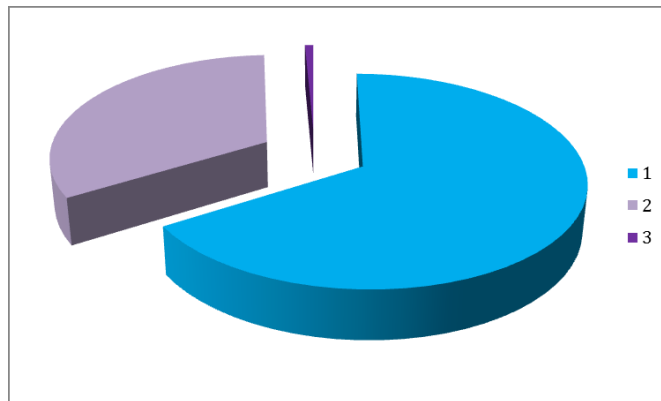


Figura 21: Rappresentazione grafica dei risultati nel gruppo di controllo, 1: genotipo CC, 2: genotipo CT, 3: genotipo TT.

Polimorfismo SNP rs2699887 del gene PI3KCA e parametri prognostici istologici

Considerando che il numero totale di melanomi con ulcerazione nella nostra casistica è pari a 5, il 20% delle neoplasie positive per tale parametro è stato rilevato in pazienti di genotipo CT/TT (eterozigoti od omozigoti per il polimorfismo analizzato) e l'80% è stato riscontrato in pazienti CC (non portatori del polimorfismo considerato). (Fig.22)

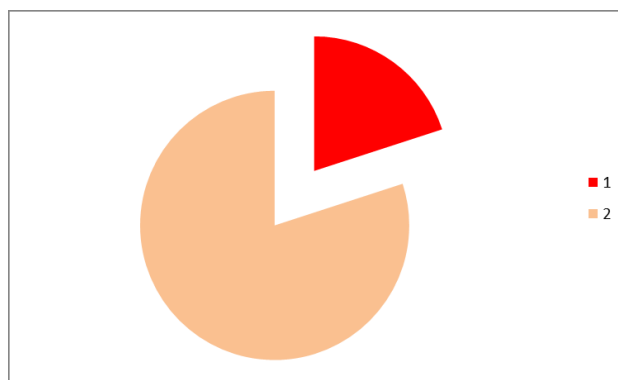


Figura 22: Rappresentazione grafica dei risultati, 1: pazienti CT/TT con ulcerazione, 2: pazienti CC con ulcerazione.

Per quanto riguarda la stratificazione dei risultati del test genetico per il polimorfismo SNP rs2699887 in base alla presenza o assenza di mitosi all'esame istologico, posto che 16 è il numero complessivo di melanomi positivi per mitosi nella nostra casistica, abbiamo rilevato che il 31,3% di questi insorgeva in pazienti CT/TT (portatori del polimorfismo in eterozigosi od omozigosi) mentre il restante 68,7% dei melanomi con mitosi insorgeva in pazienti di genotipo CC (non polimorfico). (Fig.23)



Figura 23: Rappresentazione grafica dei risultati, 1: pazienti con genotipo CT/TT positivi per mitosi, 2: pazienti con genotipo CC positivi per mitosi.

Lo spessore di Breslow medio nei pazienti CT/TT è risultato pari a 0,58mm, mentre lo spessore di Breslow medio dei pazienti CC (non portatori del polimorfismo) è risultato pari a 0,61mm. (Fig.24)

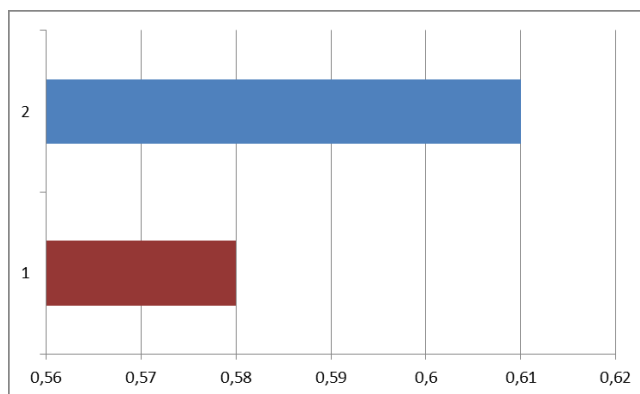


Figura 24: Rappresentazione grafica dei risultati, 1: spessore di Breslow medio nei pazienti CT/TT, 2: spessore di Breslow medio nei pazienti CC (non portatori del polimorfismo). In ascissa è riportato il valore dello spessore di Breslow in mm.

Suddividendo i pazienti in due categorie, la prima comprendente i casi con spessore di Breslow inferiore ad 1mm e la seconda i casi con lesioni di spessore maggiore o uguale ad 1mm, il 25,6% delle lesioni della prima categoria è stato riscontrato in pazienti con genotipo CT/TT (cioè etero/omozigoti per il polimorfismo studiato), mentre il 74,4% in pazienti CC (non portatori del polimorfismo). Nella seconda categoria, il 14,3% delle lesioni è stato riscontrato in pazienti con genotipo CT/TT e l'85,7% in pazienti di genotipo CC (non portatore del polimorfismo preso in esame). (Fig.25)

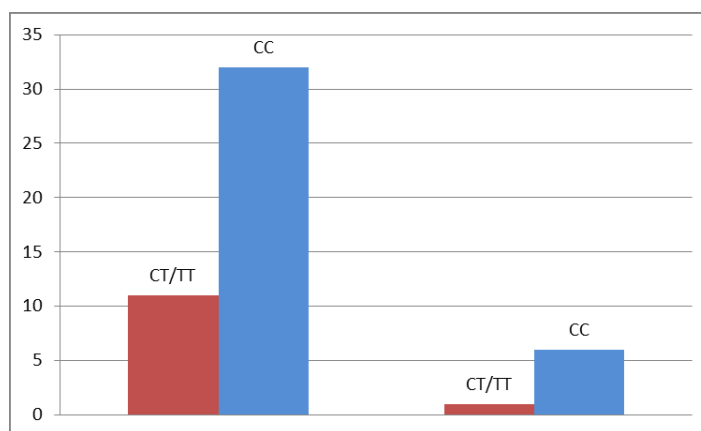


Figura 25: Rappresentazione grafica del numero di melanomi con Breslow <1mm (prime due colonne) e del numero di melanomi con Breslow ≥ 1mm (ultime due colonne), in relazione al genotipo del paziente, nell'asse delle ordinate è presente il numero delle lesioni.

Per quanto riguarda il livello di invasione di Clark, suddividendo i risultati del test genetico per il polimorfismo rs2699887 (sub-unità p110a catalitica dell'enzima PI3K), per i 5 livelli di invasione, abbiamo rilevato per ogni livello di invasione una preponderanza dei pazienti negativi per l'SNP esaminato, in particolare per il livello di invasione maggiore (IV livello, data l'assenza di pazienti con V livello di Clark nel nostro database) il 33,3% dei pazienti è risultato positivo per il polimorfismo, mentre il 66,7% negativo. Considerando esclusivamente le lesioni con primo livello di Clark (in situ), abbiamo che il 23,5% delle lesioni è stato riscontrato in pazienti

con genotipo CT/TT (eterozigoti o omozigoti per l'SNP) ed il 76,5% delle lesioni in pazienti con genotipo CC (non portatori). Considerando le lesioni interessanti il II livello di Clark, il 12,5% delle stesse è stato riscontrato in pazienti con genotipo CT o TT, mentre l'87,5% in pazienti CC (negativi per il polimorfismo esaminato). Per il III livello, il 25% delle lesioni insorgeva in pazienti CT/TT, mentre il 75% insorge in pazienti CC. (Fig.26)

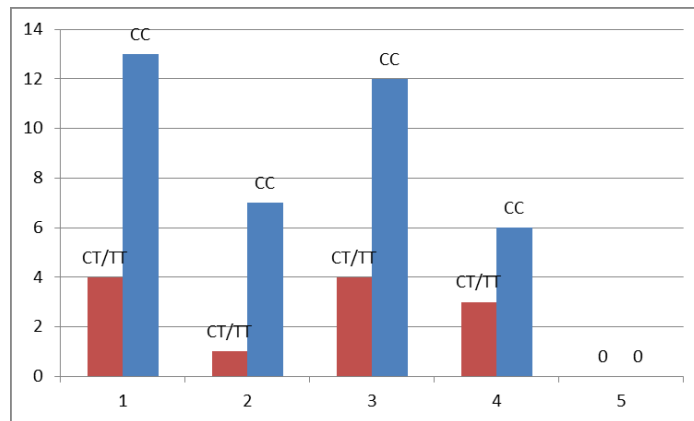


Figura 26: Rappresentazione grafica della stratificazione dei risultati a seconda del livello di invasione di Clark, in ascissa 1, 2, 3, 4, 5 rappresentano rispettivamente il I, II, III, IV e V livello di Clark, in ordinata è presente il numero delle lesioni.

Stratificando i risultati secondo lo stadio di malattia, si ottiene la seguente distribuzione: non sono presenti pazienti in stadio IIA o IIC nella nostra casistica, lo stadio più avanzato è il IIIB; per qualsiasi stadio considerato, erano più rappresentati i pazienti con genotipo CC (non portatori di polimorfismo), i pazienti portatori del polimorfismo (in omozigosi o eterozigosi) erano comunque presenti fino allo stadio IIB, ed assenti negli stadi successivi.

I pazienti CT/TT rappresentavano il 25% dei casi in stadio 0, il 18,75% dei pazienti in stadio IA, il 36,4% dei pazienti in stadio IB ed il 33,3% dei pazienti in stadio IIB.

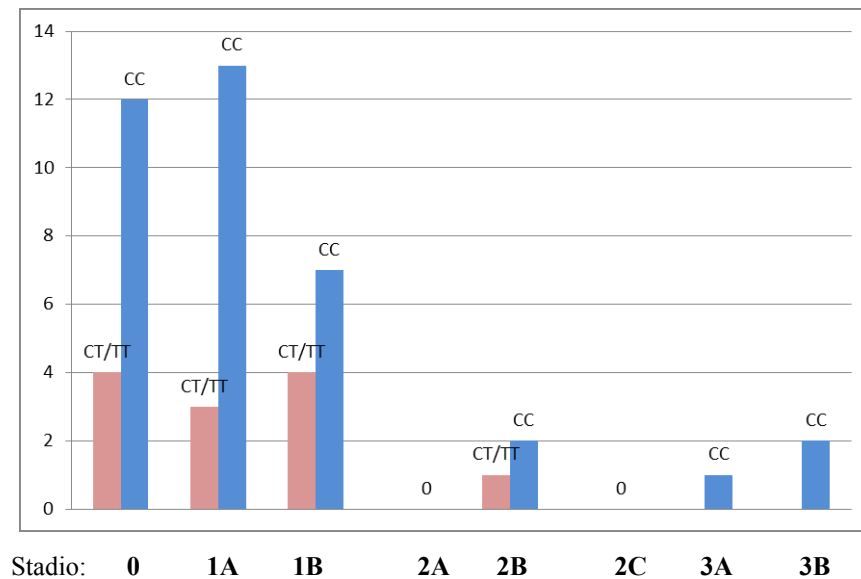


Figura 27: Rappresentazione grafica della distribuzione dei genotipi del polimorfismo rs2699887 del gene *PI3KCA* codificante per la sub-unità p110 α dell'enzima *PI3K*, a seconda dello stadio di malattia. CT/TT = pazienti eterozigoti od omozigoti per l'SNP, CC = pazienti non portatori. In ascissa è espresso lo stadio di malattia dei pazienti, in ordinata è possibile osservare il numero di lesioni, per i pazienti con storia di multiple lesioni primitive, è stata considerata la lesione in stadio più avanzato.

Per quanto riguarda la regressione istologicamente documentata, su un totale di 11 pazienti che sono risultati positivi questo parametro, il 18,2% è stato riscontrato in pazienti di genotipo CT/TT e l'81,8% in pazienti non portatori dell'SNP per il gene della sub-unità p110 α (genotipo CC). (Fig.28)

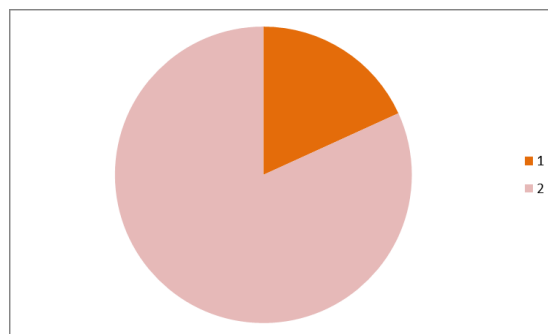


Figura 28: Rappresentazione grafica dei risultati: 1: pazienti con regressione documentata istologicamente, con genotipo CT/TT, 2: pazienti con regressione documentata istologicamente, con genotipo CC (non portatori del polimorfismo).

Stratificando ancora i risultati del test genetico per il polimorfismo del gene PI3KCA, il 29% dei pazienti che mostravano la presenza di infiltrato infiammatorio, sono risultati portatori dell'SNP (con genotipo omozigote od eterozigote), mentre il 71% dei pazienti con infiltrato infiammatorio, è risultato negativo per il polimorfismo al test genetico. (Fig.29)

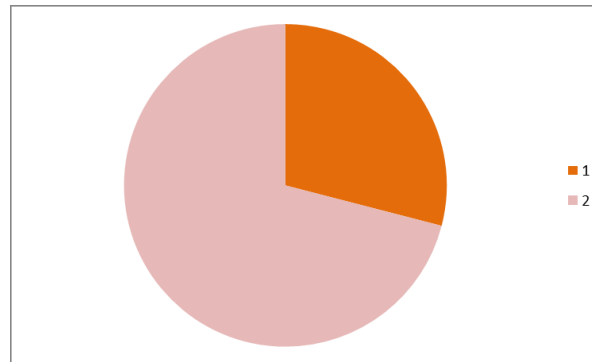


Figura 29: Rappresentazione grafica dei risultati, 1: pazienti con presenza di infiltrato infiammatorio istologicamente documentato con genotipo CT/TT, 2: pazienti con infiltrato infiammatorio con genotipo CC (non portatori del polimorfismo).

	SNP/Breslow	SNP/liv. Clark	SNP/mitosi	SNP/ulcerazione	SNP/invas. vascolare	SNP/regress.
Pearson r	0,06584	-0,04588	0,2609	-0,1348	-0,1348	-0,2
95% C.I.	-0.2165 - 0.3381	-0.6040 - 0.5424	-0.3682 - 0.7262	-0.6579 - 0.4760	-0.6579 - 0.4760	-0.6943 - 0.4225
P value	0,64	0,89	0,41	0,68	0,68	0,53

Tabella 6: Ricerca di associazione tramite coefficiente di correlazione di Pearson, tra la presenza o assenza del polimorfismo rs2699887 del gene PI3KCA nei casi, ed i principali fattori prognostici istologici del melanoma, non è evidenziabile alcuna correlazione statisticamente significativa.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Studi recenti hanno dimostrato come i fattori genetici risultino fondamentali nel condizionare oltre il 50% della differente predisposizione individuale allo sviluppo del melanoma. Nonostante questo, i classici modelli mendeliani, con mutazioni genetiche ereditarie ad alta penetranza in famiglie con multipli casi di melanoma, spiegano solo una piccola parte della predisposizione genetica, essendo alla base dell'insorgenza di un ristretto numero di neoplasie.²¹⁰

Ulteriori dati hanno permesso di chiarire come la maggior parte del rischio costitutivo sia dato da variazioni genetiche comuni nella popolazione che, prese singolarmente, conferiscono un basso rischio di sviluppo di malattia, ma che se inserite in un modello poligenico di rischio con possibilità di interazioni additive o sinergiche di più alleli conferiscono un alto rischio all'individuo. La maggior parte delle varianti genetiche incluse nel modello di rischio poligenico, è rappresentata da polimorfismi a singolo nucleotide (SNP).²²³

Gli SNP sono recentemente entrati a far parte dei modelli di suscettibilità di numerose neoplasie tra cui carcinoma esofageo, carcinoma polmonare, carcinoma del colon retto e nel melanoma, potendo non solo contribuire al rischio genetico ma condizionando anche la risposta dell'organismo a molteplici fattori di rischio ambientali.^{88,224-226}

Ulteriore interesse ha suscitato la correlazione riscontrata tra alcuni SNP e importanti fattori prognostici istologici delle neoplasie come l'associazione tra specifici SNP e il Gleason Score nel carcinoma prostatico.²²⁷

È stato parimenti dimostrato in alcune neoplasie incluso il melanoma, un ruolo degli SNP nel condizionare la prognosi del paziente in stadio avanzato, o la risposta ad alcune terapie, inclusi i regimi chemioterapici.²²⁸

In base alle conoscenze odierne, per quanto riguarda il melanoma cutaneo, sono noti solo un limitato numero di polimorfismi SNP associati a fattori prognostici istologici maggiormente sfavorevoli o ad altre caratteristiche rilevabili all'esame anatomico-patologico delle lesioni.²²³⁻²²⁶

J.G.Park et al. ha recentemente dimostrato come la presenza di 18 SNP, di cui 2 presenti nel gene PI3KCA, correli con la presenza di metastasi all'esame anatomico-patologico del linfonodo sentinella ($p < 0,05$).²²⁹ I sovracitati polimorfismi erano stati selezionati, sulla base di studi precedenti, che indicavano i geni interessati come responsabili dei fenomeni di neo-angiogenesi e linfo-angiogenesi.

La letteratura non risulta però univoca circa il ruolo di tali polimorfismi, tra cui quelli per il gene di PI3KCA, necessitando quindi di ulteriori studi per chiarire l'impatto di questi geni e dei loro polimorfismi nel decorso della malattia.²²⁹

Nella nostra casistica non abbiamo riscontrato però la presenza di SNP del gene PI3KCA, nè di SNP del gene PIK3R1 nei pazienti affetti da metastasi linfonodali. È possibile tuttavia che il dato sia in parte condizionato dalla prevalenza nel nostro database di pazienti con melanoma in situ o malattia in stadio iniziale, senza coinvolgimento sistemico (solo il 5% dei pazienti è risultato affetto da metastasi linfonodali).

Anche la correlazione tra polimorfismi genetici e caratteristiche istologiche del melanoma è stata indagata a fondo negli ultimi anni. È stata infatti riscontrata la predominanza di melanomi con variante clinico-istologica a diffusione superficiale e nodulare, in pazienti portatori del polimorfismo rs10757257 del gene metil-tioadenosina fosforilasi (MTAP) ed un aumento del rischio di incidenza nei soggetti portatori di tale polimorfismo.²³⁰

Narita et al., in uno studio che ha preso in esame un polimorfismo SNP della regione juxtamembrana del recettore per il GDNF codificato dal gene RET capace di incrementare l'attivazione del recettore stesso in seguito al legame con il fattore di crescita, ha riscontrato la espressione di tale polimorfismo in neoplasie caratterizzate da aspetti di neurotropismo come l'adenocarcinoma pancreatico ed il melanoma di tipo desmoplastico. Il polimorfismo è risultato inoltre capace di aumentare l'invasività e la capacità di migrazione delle cellule di melanoma cutaneo, tramite l'attivazione della via di segnalazione della PI3K, indagata nel nostro studio.²³¹

I portatori del polimorfismo per l'allele di rischio di sviluppo melanoma MITF E318K secondo un recente studio, sarebbero maggiormente propensi allo sviluppo di melanomi amelanotici, la cui percentuale d'incidenza incrementa sino al 30% rispetto al 2-8% della popolazione generale.²³²

Questo dato, se confermato, potrebbe comportare novità in campo diagnostico consentendo mediante un più attento e serrato follow up una precoce diagnosi nei pazienti portatori di tale mutazione.²³²

Entrambi i polimorfismi presi in esame nel nostro studio presentano una comprovata azione di facilitazione nell'attività della via di segnalazione di PI3K, elemento che, come in precedenza delucidato, gioca un ruolo fondamentale nella progressione del melanoma e di altre neoplasie.

Stimolati da questo e dai risultati degli studi sopra citati, abbiamo ricercato la presenza di una correlazione tra la presenza di polimorfismi dei geni PI3KCA e PIK3R1, ed i principali fattori prognostici istologici del melanoma cutaneo. Non sono emerse associazioni statisticamente significative con lo spessore di Breslow, con la presenza di ulcerazione, con la conta mitotica misurata come numero di mitosi/mm², con il livello di invasione di Clark, con la presenza di regressione istologicamente documentata o di invasione linfo-vascolare.

È comunque rilevante nella nostra casistica, il particolare genotipo del paziente n.33, si tratta infatti dell'unico paziente che mostrava la compresenza dei due polimorfismi in studio, risultando portatore del polimorfismo rs2699887 del gene PI3KCA in eterozigosi e del polimorfismo rs3730089 del gene PIK3R1 in omozigosi. Il genotipo del paziente risultava quindi C/T per PI3KCA e A/A per il gene PIK3R1. Questo implica il sommarsi nello stesso individuo di ben tre alleli che hanno la capacità, secondo studi derivanti da altre neoplasie, di determinare una maggiore attivazione della via della PI3K.

L'esame istologico del paziente n.33 mostrava infatti la contemporanea presenza dei criteri prognostici sfavorevoli più rilevanti, nell'ambito della casistica esaminata, come la presenza simultanea di 3mitosi/mm² e di ulcerazione istologicamente confermata a fronte di uno spessore di Breslow di soli 0,47mm.

Questa situazione rispecchia il modello poligenico di rischio attualmente condiviso nella caratterizzazione della genetica di malattia, secondo cui, ciascun polimorfismo genetico rappresentante un allele comporterebbe un minimo aumento di rischio di sviluppo di malattia nel soggetto portatore o conferirebbe caratteristiche di decorso sfavorevole alla patologia, con possibilità però di un effetto additivo, dato dalla somma di più alleli "a rischio".

L'attendibilità di tale modello è stata recentemente documentata, per i polimorfismi presi in esame nel nostro studio, dai lavori di L.Li et al. e di Q.Li et al., che hanno analizzato il legame dei due polimorfismi e il carcinoma del colon retto e dei carcinomi non a piccole cellule del polmone.^{11,12}

Dal confronto parallelo della distribuzione dei due polimorfismi presi in esame nel nostro gruppo di pazienti, l'SNP del gene PIK3R1 codificante per la sub-unità p85α dell'enzima PI3K, non è presente in pazienti di stadio superiore all'IB, mentre l'SNP del gene PI3KCA, codificante per la sub unità catalitica p110α dell'enzima PI3K, è rappresentato fino allo stadio IIB della nostra casistica. Il polimorfismo del gene codificante per p85α inoltre è risultato espresso solo nei melanomi con Clark I, II e III ed assente nel IV livello, mentre l'SNP del gene codificante per p110α viene manifestato in tutti i livelli di Clark della nostra casistica, con il 25% delle lesioni insorte in pazienti eterozigoti od omozigoti caratterizzati da un livello di Clark pari a IV. Lo spessore di Breslow medio nei pazienti portatori del polimorfismo del gene codificante per p85α è risultato inferiore del 50% rispetto a quello dei pazienti portatori del polimorfismo del gene codificante per p110α (0,25mm contro 0,58mm).

Queste differenze potrebbero essere spiegate in base ad un diverso effetto biologico dei due polimorfismi infatti, nell'articolo di L.Li et al. il polimorfismo del gene di p85 α era esclusivamente correlato con il rischio di insorgenza di carcinoma del colon, mentre il polimorfismo del gene p110 α nell'articolo di Q.Li et al. comportava un aumento nel rischio di metastatizzazione.²²⁰⁻²²¹

Sono comunque necessari ulteriori studi per confermare un simile significato biologico dei due polimorfismi, in neoplasie molto differenti tra loro, sia sul piano clinico che molecolare.

La maggior parte dei polimorfismi SNP studiati finora nel melanoma cutaneo condizionano un aumentato rischio per l'insorgenza della neoplasia comportandosi, per la maggior parte dei casi, come alleli di rischio a bassa penetranza (contrapposti agli alleli di rischio ad alta penetranza, ad esempio la mutazione germinale del gene CDKN2A o di CDK4, come già illustrato).

I polimorfismi che finora hanno mostrato di incrementare il rischio di insorgenza di melanoma, sono localizzati su geni correlabili a caratteristiche fisiche dell'individuo, influenzando il fenotipo (come ad esempio il gene MC1R), su geni implicati nella risposta cellulare al danno da UV e nello sviluppo dei melanociti (come ad esempio MITF), su geni codificanti per proteine appartenenti ai sistemi di riparazione del DNA, o su geni codificanti per importanti regolatori del ciclo cellulare (come ad esempio il polimorfismo A148T di CDKN2A). Sempre considerando i polimorfismi che comportano un aumentato rischio di insorgenza di malattia, si conoscono inoltre SNP di geni codificanti per componenti fondamentali del metabolismo (polimorfismi del recettore della vitamina D) per molecole implicate nella risposta immunitaria (ad esempio polimorfismi dell'inteleukina-10) o per componenti di vie di segnalazione intracellulare (come ad esempio i polimorfismi del gene KIT).

Nell'ambito di quest'ultima classe funzionale di SNP vanno ad inserirsi anche i due polimorfismi analizzati nel nostro studio. In particolare alla PI3K fa capo un pathway intracellulare di sempre maggiore interesse ed oltre alla sua implicazione nell'insorgenza e nella progressione di molte neoplasie, Davies et al., in un recente studio, hanno evidenziato come l'attivazione di questa via di segnalazione molecolare nel melanoma comporti una minore sopravvivenza nel paziente, ed una precoce metastatizzazione (soprattutto con metastasi al SNC), inoltre proprio nell'attivazione della via della PI3K risiederebbe uno dei principali meccanismi di resistenza delle cellule del melanoma all'apoptosi mediata dalle nuove terapie a bersaglio molecolare (inibitori di BRAF e di MEK).²³³

Nonostante questo, Curtin et al. hanno rilevato che nel melanoma le mutazioni somatiche che causano un'attivazione aberrante della via della PI3K in molte neoplasie (come ad esempio

quelle dell'esone 9 e dell'esone 20, e più in generale mutazioni somatiche nelle molteplici sub-unità regolatorie o catalitiche dell'enzima), sono piuttosto rare, per cui gli Autori concludevano rilevando la necessità di ulteriori studi volti a chiarire le precise modalità di attivazione nel melanoma della PI3K e dei suoi effettori.²³⁴

Recentemente è stato pubblicato uno studio di Manca et al. che evidenzia come la presenza di mutazioni attivanti del gene PI3KCA possano coesistere con quelle oramai da tempo caratterizzate di BRAF o NRAS, identificando un particolare sub-set di pazienti che in futuro potrà beneficiare di migliori terapie.²³⁵

Il nostro studio per primo ha valutato il ruolo di polimorfismi SNP dell'enzima PI3K (presenti quindi nella linea germinale dell'individuo, e non acquisiti come mutazione somatica) di provato significato patologico in altre neoplasie (colon e polmone), nel condizionare il rischio di insorgenza del melanoma.

Per quanto riguarda il polimorfismo rs2699887 del gene PI3KCA, la frequenza sperimentale dell'allele C (allele non polimorfico) nel gruppo dei controlli sani è dell'82,48%, mentre la frequenza sperimentale nel gruppo dei pazienti colpiti da melanoma, è dell'86%. La frequenza sperimentale dell'allele T (esito della sostituzione nucleotidica, o polimorfico) nel gruppo dei controlli sani è del 17,52%, mentre la frequenza sperimentale nel gruppo dei pazienti è del 14%. Si potrebbe ipotizzare quindi, solo in base alle frequenze alleliche, un apparente effetto protettivo del polimorfismo in questione, ma con dato lontano dalla significatività statistica, ed un incerto valore clinico-biologico. Seguendo però il modello di rischio spesso evidenziato in molti studi, secondo cui gli individui a maggior rischio sono quelli in cui si assiste alla somma di più alleli sfavorevoli, è evidente tra i due gruppi una differenza statisticamente significativa ($p=0,04$) tra la frequenza di alleli in omozigosi nel gruppo dei pazienti, rispetto al gruppo dei controlli sani (dove il riscontro di soggetti omozigoti per il polimorfismo di PI3KCA, gene codificante per la sub unità catalitica p110 α è rarissimo). È probabile che la non elevata numerosità del campione non consenta di cogliere a pieno l'effetto del polimorfismo in tutti i soggetti, ma permetta di evidenziare differenze significative solo in quelli più esposti al rischio, l'odds-ratio per gli omozigoti risulta essere di 5,6 con I.C. 95% = 1,02-31,2. In base a questi risultati, è possibile considerare la presenza degli alleli polimorfici in omozigosi per il polimorfismo rs2699887, come un nuovo fattore di rischio genetico per lo sviluppo del melanoma cutaneo.

Per quanto riguarda il polimorfismo rs3730089 del gene PIK3R1, codificante per la sub-unità regolatoria p85 α dell'enzima PI3K, la frequenza sperimentale dell'allele G (“*wild-type*” o non interessato dal polimorfismo) è dell'89,78% nel gruppo dei sani, mentre tale percentuale scende all'87,25% nel gruppo dei malati. La presenza dell'allele A (esito della sostituzione nucleotidica, o polimorfico) nel gruppo dei sani, è del 10,22%, percentuale che sale al 12,75% nel gruppo dei pazienti. Si potrebbe ipotizzare quindi, solo in base alle frequenze alleliche, un apparente effetto favorente l'insorgenza del melanoma da parte del polimorfismo in questione, ma con dato che non raggiunge la significatività statistica, ed un incerto valore clinico-biologico. Se ci si concentra sull'analisi della differenza di alleli in omozigosi tra i due gruppi, seguendo il modello di rischio già esposto, il dato circa un aumento del rischio di insorgenza di melanoma nei soggetti con polimorfismo del gene PIK3R1 migliora di significatività statistica ($p=0,15$) pur rimanendo non significativo. È probabile che le dimensioni del campione siano troppo esigue per evidenziare con maggiore precisione un effetto favorente l'insorgenza del melanoma da parte del polimorfismo in esame. È comunque previsto un ampliamento del campione dei malati e dei controlli sani, per poter raggiungere una migliore significatività e per meglio analizzare l'effetto, anche combinato, dei due polimorfismi presi in esame.

Il polimorfismo rs2699887 del gene PI3KCA, cade in una regione intronica del gene, mentre il polimorfismo rs3730089 del gene PI3R1, interessa una regione esonica, presente quindi nella catena polipeptidica finale e nella proteina p85 α (dominio SH2 della molecola, deputato al legame con i recettori tirosin-kinasici di membrana attivati da fattori di crescita, fase fondamentale dell'attivazione della PI3K). Questi dati non sono in contraddizione con quanto appena esposto, dato che anche gli introni sono stati implicati nel processo di regolazione dell'espressione genica, e nei processi epigenetici, per cui mutazioni e polimorfismi su sequenze introniche possono avere un effetto su queste funzioni, e più in generale un effetto biologico.

In conclusione, nell'ultimo decennio si stanno evidenziando un grande numero di polimorfismi genetici comportanti soprattutto un aumento del rischio d'insorgenza del melanoma. Alcuni sono di grande utilità clinica, in quanto non correlano con caratteristiche fenotipiche rilevabili nel paziente, o addirittura correlano con caratteristiche fenotipiche che apparentemente espongono il soggetto ad un rischio minore rispetto ad altre (assenza di nevi, capelli scuri, ad esempio, per l'SNP E318K del gene MITF), per cui la caratterizzazione di questi polimorfismi potrebbe portare, in tempi brevi, ad un modello di predizione del rischio di melanoma che integra caratteristiche clinicamente rilevabili con caratteristiche del genotipo, superando gli attuali limiti, ed aprendo la strada ad approcci di screening sempre più efficaci e modulati in base al reale

rischio del singolo individuo. Tale approccio basato sull'integrazione d'informazioni cliniche e genotipo del singolo, può aprire comunque altre interessanti prospettive, considerando il fatto che perfino pazienti con melanomi di spessore di Breslow inferiore al millimetro, sviluppano metastasi a distanza, talvolta in tempi particolarmente lunghi (più di 10anni), per cui riuscire a suddividere questi pazienti in specifici sottogruppi di rischio, migliorando gli attuali sistemi basati esclusivamente su criteri istologici, potrebbe portare grandi benefici in termini terapeutici e di sopravvivenza.

BIBLIOGRAFIA:

1. Bologna J, Jorizzo J, Schaffer J. Melanoma. In: *Dermatology: Expert Consult Premium Edition*, 3rd Edition. Elsevier – Mosby, 2012.
2. El Ammari JE. Primary malignant melanoma of the urinary bladder case reports. *Urology*, Vol.13:23,548,2011.
3. Dountsis A, Zisis C, Karagianni E, Dahabreh J. Melanoma. *World journal of surgical oncology*, 158:2-3, 2003.
4. Murphy GF, Sellheyer K, Mihm MC. Melanoma. In: *Le basi patologiche delle malattie* (E. Vincenzi) ottava edizione. Elsevier 2010.
5. Bertolotto C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. *Scientifica*, 122:1,2013.
6. Silva JH. Atypical mole syndrome and dysplastic nevi: identification of populations at risk for developing melanoma. *Clinics*, 66(3):493-499,2011.
7. Braeuer RR, Watson IR, Wu CJ, et al. Why is melanoma so metastatic? *Pigment cell & melanoma research*, 27:19-36,2013.
8. Alamodi AA, Eshaq AM, Hassan SY et al. Cancer stem cell as therapeutic target for melanoma treatment. *Histol Histopathol*, 31(12):1291-301,2015.
9. Murray CS. Thick melanoma, the challenge persists. *British journal of dermatology*, 152:104-9, 2005.
10. Popova T. Germline BAP-1 mutation predispose to RCC. *The American journal of human genetics*, 92:974–980,2013.
11. Li L, Plummer SJ, Thompson CL, Tucker TC, Casey G. Association between Phosphatidylinositol 3-Kinase Regulatory Subunit p85A Met326Ile Genetic Polymorphism and Colon Cancer Risk. *Clin Cancer Res*, 14(3): 633-637,2008.
12. Li Q, Yang J, Yu Q, et al. Associations between Single-Nucleotide Polymorphisms in the PI3K-PTEN-AKT-mTOR Pathway and Increased Risk of Brain Metastasis in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 19:6252-6260,2013.
13. Held L, Eigentler TK, Meier F, Held M, Röcken M, Garbe C. Oncogenetics of melanoma: basis for molecular diagnostics and therapy. *Journal of the german society of dermatology*, 9:510-516,2011.
14. Nikolaou V, Stratigos AJ. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *British journal of dermatology*, 170:11-19,2014.
15. GLOBOCAN 2012, estimated cancer incidence, mortality and prevalence, IARC. Available at: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
16. MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol*, 20(6):vi1–7,2009.
17. Siegel R. Cancer statistics 2014. *Cancer*, 64,9-29,2014.
18. I numeri del cancro in Italia 2015, AIOM-AIRTUM. Available at: http://www.registri-tumori.it/PDF/AIOM2015/I_numeri_del_cancro_2015.pdf.
19. Baade P, Coory M. Trends in melanoma mortality in Australia: 1950–2002 and their implications for melanoma control. *Aust N Z J Public Health*, 29:383–6,2005.

20. de Vries E, Hontermans S, Jansses-Heijnen MLG, et al. Up-to-date survival estimates and historical trends of cutaneous malignant melanoma in the south-east of the Netherlands. *Ann Oncol*, 18:1110–6,2007.
21. Testori A, Soteldo J, et al. Cutaneous melanoma in the elderly. *Melanoma research*, 19:125-134,2009.
22. Newton-Bishop JA. Melanoma. In: *Rook's textbook of dermatology*, eighth edition. Blackwell Publishing, 2010.
23. Leite Viana AC, Gontijo B, et al., Giant congenital melanocytic nevus. *An Bras Dermatol*, 88(6):863-78, 2013.
24. AIOM, linee guida melanoma, ed. 2015. Available at: <http://www.aiom.it/professionisti/documenti-scientifici/linee-guida/melanoma/1,718,1>.
25. Geoffrey B, Yang J, et al. Risk and survival of cutaneous melanoma diagnosed subsequent to a previous cancer. *Arch dermatol*, 147(12):1395-1402,2011.
26. Goggins W. Association between female breast cancer and cutaneous melanoma. *Int J Cancer*, 111:792-794,2004.
27. Liu R. Meta-analysis of the relationship between parkinson's disease and melanoma. *Neurology*, 76:2002-2009,2011.
28. Olsen CM, Knight LL, Green AC. Risk of Melanoma in People with HIV/AIDS in the Pre- and Post-HAART Eras: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. *PLoS ONE*, 9(4): e950,2014.
29. Bruce S, Mackie E. Melanoma and dietary lipids. *Nutrition and cancer*, 9: 219-226,1987;
30. Sergentanis TN. Obesity and risk of malignant melanoma: a meta-analysis of cohort and case-control studies. *Eur J Cancer*, 49(3):642-57,2013.
31. H.Gogas. Melanoma risk in association with serum leptine levels and lifestyle parameters: a case-control study. *Annals of oncology*, 19:384-389,2008.
32. Jing Zhou. Melanoma incidence rates among whites in the U.S. military. *Cancer epidemiol Biomarkers prevention*, 20(2),318-23,2010.
33. Ward EM, Burnett CA, Bruce S, et al., Industries and cancer. *Cancer Causes Control*, 8:356–70,1997.
34. Dahlke R. Systematic review of melanoma incidence and prognosis in solid organ transplant recipients. *Transplantation research*, 3:10, 2014.
35. Wen-Quing Li, Abrar A, Qureshi T, et al. Sildenafil use and increased risk of incident melanoma in US men: a prospective cohort study. *JAMA Intern Med*, 174(6):964–970, 2014.
36. Basi scientifiche per la definizione di linee-guida in ambito clinico per il Melanoma cutaneo, febbraio 2012,ISS. Available at :http://www.lamiapelle.salute.gov.it/imgs/C_17_downloadMiaPelle_4_allegati_it emAllegati_0_allegato.pdf.
37. Elwood JM. Pigmentation and skin reaction to sun as risk factors for cutaneous melanoma: Western Canada Melanoma Study. *British medical journal*, 288:99-102,1984.
38. Chiarugi A. Sensitivity to ultraviolet B is a risk factor for cutaneous melanoma in a Mediterranean population: results from an Italian case-control study. *Clin Exp Dermatol*, 34(1):8-15,2009.
39. Olsen CM, Carroll HJ, Whiteman DC. Estimating the attributable fraction for melanoma: a meta-analysis of pigmentary characteristics and freckling. *Int J Cancer*, 127(10):2430-45,2010.
40. Echeverria B. Indicators for the total number of melanocytic naevi: an adjunct for screening campaigns. Observational study on 292 patients. *British journal of dermatology*, 170:144-149,2014.

41. Olsen M. Estimating the Attributable Fraction for Cancer: A Meta-analysis of Nevi and Melanoma. *Cancer prevention research*, 3(2):233-245,2010.
42. Falchi A. Loci at 9p21 and 22q13 harbour alleles for development of cutaneous nevi and melanoma. *Nat Genet*, 41(8): 915–919,2009.
43. Weiss SA, Hanniford D, Hernando E, Osman I. Revisiting determinants of prognosis in cutaneous melanoma. *Cancer*, 1;121(23):4108-23,2015.
44. Rauschenberg R, Garzarolli M, Dietrich U, Beissert S, Meier F. Systemic therapy of metastatic melanoma. *J Dtsch Dermatol Ges*, 13(12):1223-35,2015.
45. Duan L, Mukherjee EM, Narayan D3. Tailoring the Treatment of Melanoma: Implications for Personalized Medicine. *Yale J Biol Med*, 24;88(4):389-95, 2015.
46. Krengel S. Melanoma risk in congenital melanocytic naevi: a systematic review. *British journal of dermatology*, 155: 1-8,2006.
47. Udayakumar D. Genetic determinants of cutaneous melanoma predisposition. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 29:190-195,2010.
48. Hawryluk EB, Hensin T. Melanoma: clinical features and genomic insights. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4:09,015388,2014.
49. Goldstein AM. Genotype–phenotype Relationships in U.S.Melanoma-Prone Families With CDKN2A and CDK4 Mutations. *Journal of the National Cancer Institute*, 5:1006-1010,2000.
50. Hensin T. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes&development*, 26:1131–1155,2012.
51. Demenais F, Mohamdi H, Chaudru V, et al. the Melanoma Genetics Consortium, Association of MC1R Variants and Host Phenotypes With Melanoma Risk in CDKN2A Mutation Carriers: A GenoMEL Study. *J Natl Cancer Inst*, 102:1568–1583,2010.
52. Ching-Ni JN, Kim I, Piris A, et al. Germline BAP1 Inactivation Is Preferentially Associated with Metastatic Ocular Melanoma and Cutaneous-Ocular Melanoma Families. *Plo sone*, 7(4): e352,2012.
53. Horn S. TERT Promoter Mutations in Familial and Sporadic Melanoma. *Science* 339,959-961,2013.
54. Griewank KG. TERT Promoter Mutations Are Frequent in Cutaneous Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma, *Plos one*, 8(11):2013.
55. Franklin W, Huang J. Highly Recurrent TERT Promoter Mutations in Human Melanoma. *Science*, 339:957-959,2013.
56. Latreille J. MC1R gene polymorphism affects skin color and phenotypic features related to sun sensitivity in a population of French adult women. *Photochem.Photobiol*,85(6):1451-8,2009.
57. Berwick M. MITF E318K’s effect on melanoma risk independent of, but modified by, other risk factors. *Pigment Cell Melanoma Res*, 27: 485–488,2014.
58. Yokoyama S., Woods S.L. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature*, 480: 99-105,2011.
59. Guilherme F, Priscila D, Cirilo R, Gonçalves FT, Tortelli TC, Chammas R. Melanoma Genetics: From Susceptibility to Progression, Melanoma - From Early Detection to Treatment, Dr. Ht Duc (Ed.),2013. Available at: <http://www.intechopen.com/books/melanoma-from-early-detection-to-treatment/melanoma-genetics-from-susceptibility-to-progression>.
60. Gandini S, Raimondi S. Vitamin D and skin cancer: A meta-analysis. *European journal of cancer*, 45: 634–641,2009.

61. Zeljic K, Kandolf-Sekulovic L, Supic G. Melanoma risk is associated with vitamin D receptor gene polymorphisms. *Melanoma research*, 24(3):273-9,2014.
62. Reisenauer A. Management of Melanoma in a Patient Population: Using Electronic Health Records to Enhance Postdiagnosis Surveillance. *JAMA dermatol*, 149(3):365-366,2013.
63. Jung GW, Dover DC, Salopek TG. Risk of second primary malignancies following a diagnosis of cutaneous malignant melanoma or nonmelanoma skin cancer in Alberta, Canada from 1979 to 2009. *British journal of dermatology*, 170:136–143,2014.
64. Ong EL. Differential risks of cancer types in people with Parkinson's disease: A national record-linkage study. *European journal of cancer*, 50(14): 2456–2462,2014.
65. Bertoni JM, Arlette JP. Increased Melanoma Risk in Parkinson Disease. *Arch Neurol*, 67(3): 347-352,2010.
66. Gao X. Family history of melanoma and Parkinson disease risk. *Neurology*, 73:1286–1291,2009.
67. Lee BR, Matsuo Y. Role of Ser129 phosphorylation of a-synuclein in melanoma cells. *Journal of Cell Science* 126(2): 696-704,2013.
68. Whiteman DC. Anatomic site, sun exposure and risk of cutaneous melanoma. *Journal of clinical oncology*, 24:3172-3177,2006.
69. Brozyna A. Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma. *Expert Rev Dermatol* 2(4):451–469,2007.
70. Nelemans PJ. Effect of Intermittent Exposure to Sunlight on Melanoma Risk Among Indoor Workers and Sun-Sensitive Individuals. *Environmental health perspectives*, 101:252-255,1993.
71. Colantonio S. The association of indoor tanning and melanoma in adults: Systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol*, 70:847-57,2014.
72. Veierød MB. A Prospective Study of Pigmentation, Sun Exposure, and Risk of Cutaneous Malignant Melanoma in Women. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 95,No.20,1530-1538,2003.
73. Denkins Y. Role of w -3 polyunsaturated fatty acids on cyclooxygenase-2 metabolism in brain-metastatic melanoma. *Journal of lipid research*, 46:1278-1284,2005.
74. Sakai M. Arachidonic acid and cancer risk: a systematic review of observational studies. *BMC Cancer*, 12:606,2012.
75. Martinez GL. Serum level changes of long chain-polyunsaturated fatty acids in patients undergoing periodontal therapy combined with one year of omega-3 supplementation: a pilot randomized clinical trial. *J Periodontal Implant Sci*, 44:169-177,2014.
76. Rota M. Alcohol drinking and cutaneous melanoma risk: a systematic review and dose–risk meta-analysis. *British journal of dermatology*, 170:1021–1028,2014.
77. Amjadi S. Leptin promotes melanoma tumor growth in mice related to increasing circulating endothelial progenitor cells numbers and plasma NO production. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 30:21,2011.
78. Nemazannikova N. Role of vitamin D metabolism in cutaneous tumour formation and progression. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65: 2–10,2012.
79. Caini S. Vitamin D and melanoma and non-melanoma skin cancer risk and prognosis: A comprehensive review and meta-analysis. *European journal of cancer*, 50(15):2649-2658,2014.
80. Fortes C. A protective effect of the Mediterranean diet for cutaneous melanoma. *International Journal of Epidemiology*, 37:1018–1029, 2008.

81. Zhang YP, Chu RX, Liu H. Vitamin A Intake and Risk of Melanoma: A Meta-Analysis. *Plos one*, 9(7):2014.
82. Faisal R. Melanoma in organ transplant recipients: incidence, outcomes, and management considerations. *Journal of skin cancer*, 40:4-15,2012.
83. Clinical practice guidelines for the management of melanoma in Australia and New Zealand, 2008. Available at:<http://www.cancer.org.au/content/pdf/HealthProfessionals/ClinicalGuidelines/ClinicalPracticeGuidelines-ManagementofMelanoma.pdf>.
84. Krone B, Kolmel KF, Grange JM, et al. Impact of vaccinations and infectious diseases on the risk of melanoma evaluation of an EORTC case-control study. *Eur J Cancer*, 39: 2372-2378,2003.
85. Gamba CA. Aspirin is associated with lower melanoma risk among post-menopausal caucasian women: the women's health initiative. *Cancer*, 119(8),15,2013.
86. Livingstone E. Statin use and its effect on all-cause mortality of melanoma patients: a population-based Dutch cohort study. *Cancer medicine*, 3(5):1284–1293,2014.
87. Koomen ER, Joosse A. Is statin use associated with a reduced incidence, a reduced Breslow thickness or delayed metastasis of melanoma of the skin? *Eur J Cancer* 43:2580–2589,2007.
88. McCourt C, Coleman HG, Price F, et al. Beta-blocker usage after malignant melanoma diagnosis and survival: a population-based nested case–control study. *British journal of dermatology*, 170: 930-938,2014.
89. Lemeshow S, ørensen HT, Phillips G, et al. β-Blockers and survival among Danish patients with malignant melanoma: a populationbased cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20:2273–9,2011.
90. Emmert S, Kraemer KH. Do Not Underestimate Nucleotide Excision Repair: It Predicts Not Only Melanoma Risk but Also Survival Outcome. *Journal of Investigative Dermatology*, 133:1713–1717,2013.
91. Palmieri G, Colombino M, Sini MC, Ascierto PA, Lissia A, Cossu A (2013). Targeted Therapies in Melanoma: Successes and Pitfalls, Melanoma – From Early Detection to Treatment, Dr. HtDuc (Ed.), 2013. Available at :<http://www.intechopen.com/books/howto-reference/melanoma-from-early-detection-to-treatment/targeted-therapies-in-melanoma-successes-and-pitfalls>.
92. Grønbaek K. Epigenetic changes in cancer. *Apmis*, 115:1039–1059,2007.
93. Hodis E. A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. *Cell*, 150(2):251–263,2012.
94. Dahl C, Guldborg P. The genome and epigenome of malignant melanoma, *Apmis*, 115:1161–1176,2007.
95. Yajima I. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. Hindawi Publishing Corporation Dermatology Research and Practice, Volume 13,145.3,2012. Available at : <https://www.hindawi.com/journals/drpr/2012/354191/abs/>.
96. Russo AE. Melanoma: Molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review). *International journal of oncology*, 34:1481-1489,2009.
97. Menzies AM. Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma. *Drug Design Development and Therapy*, 59:6,391–405,2012.
98. Molina-Vila MA, de-Las-Casas CM, Bertran-Alamillo J, Jordana-Ariza N, González-Cao M, Rosell R. cfDNA analysis from blood in melanoma. *Ann Transl Med*, 5;3(20):309,2015.
99. Levy C. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in Molecular Medicine*, 12(9):406-414,2006.

100. Garg M. Epithelial-mesenchymal transition - activating transcription factors - multifunctional regulators in cancer. *World J Stem Cells*, 5(4):188-195,2013.
101. Yadav L. Matrix Metalloproteinases and Cancer - Roles in Threat and Therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(3):1085-1091,2014.
102. Ria R. Angiogenesis and Progression in Human Melanoma. *Dermatology Research and Practice*, vol 16,152.2,2010.
103. Kim JE. Heterogeneity of expression of epithelial–mesenchymal transition markers in melanocytes and melanoma cell lines. *Frontiers in genetics*, 4:97,2013.
104. Nemlich Y, Greenberg E, Ortenberg R, et al. MicroRNA-mediated loss of ADAR1 in metastatic melanoma promotes tumor growth. *J Clin Invest*, 123(6):2703–2718,2013.
105. Tomaselli S, Bonamassa B. ADAR Enzyme and miRNA Story: A Nucleotide that Can Make the Difference. *International journal of molecular sciences*, 14,22796-2816;2013.
106. Marzuka A, Huang L, Theodosakis N, Bosenberg M. Melanoma Treatments: Advances and Mechanisms. *J Cell Physiol*, 230(11):2626-33,2015.
107. Kashani-Sabet M. Molecular markers in melanoma. *British journal of dermatology*, 170: 31-35,2014.
108. Curtin JA. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *New England journal of medicine*, 353(20): 2135-2147,2005.
109. Nissan MH. Loss of NF1 in Cutaneous Melanoma Is Associated with RAS Activation and MEK Dependence. *Cancer Res*, 74(8):2340-2350,2014.
110. Lázár V. Characterization of candidate gene copy number alterations in the 11q13 region along with BRAF and NRAS mutations in human melanoma. *Modern pathology*, 22,1367–1378,2009.
111. Fedorenko IV. Beyond BRAF: where next for melanoma therapy? *British journal of cancer*, 1–10,1038 ,2014.
112. Scolyer RA. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Molecular oncology*, 5:124-136,2011.
113. Koopmans AE. Patient survival in uveal melanoma is not affected by oncogenic mutations in GNAQ and GNA11. *British journal of cancer*, 109:493-496,2013.
114. Noto G. On the clinical significance of cutaneous melanoma's precursors. *Indian Dermatology Online Journal*, 3:83-88,2012.
115. Edwards SJ, Osei-Assibey G, Wakefield V. Vivascope(©) For Diagnosing Melanoma: A Systematic Review. *Value Health* 18(7):A344,2015.
116. Kuzu OF, Nguyen FD, Noory MA, Sharma A. Current State of Animal (Mouse) Modeling in Melanoma Research. *Cancer Growth Metastasis* Oct 6;8(Suppl 1):81-94,2015.
117. Nikfarjam J. Congenital Melanocytic Nevi and the Risk of Malignant Melanoma: Establishing a Guideline for Primary-Care Physicians. *EJBM*, 27(2):59-66,2011.
118. Goldstein AM, Tucker MA. Dysplastic Nevi and Melanoma. *Epidemiol Biomarkers Prev*, 22(4):528–32,2013.
119. DePeralta DK, Boland GM. Melanoma: Advances in Targeted Therapy and Molecular Markers. *Ann Surg Oncol*, 554;22(11):3451,2015.
120. T.M. Skender-Kelnenas. Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma? *J Am Acad Dermatol*, 33(6):1000-7,1995.

121. Goodson AG, Grossman D. Strategies for early melanoma detection: approaches to the patient with nevi. *J Am Acad Dermatol*, 60(5):719–738,2009.
122. Karachaliou N, Pilotto S, Teixidó C, et al. Melanoma: oncogenic drivers and the immune system. *Ann Transl Med*, 20;3(18):265,2015.
123. Bono A, Bartoli C. Micro-melanoma detection. A clinical study on 22 cases of melanoma with a diameter equal to or less than 3mm. *Tumori*, 90:128-131,2004.
124. Curti BD, Urba WJ. Clinical deployment of antibodies for treatment of melanoma. *Mol Immunol*, Oct;67(2 Pt A):18-27,2015.
125. Rashid OM, Zager JS. Genetic Testing in the Multidisciplinary Management of Melanoma. *Surg Oncol Clin N Am*, 24(4):779-93,2015.
126. Situm M. Melanoma Clinical, Dermatoscopic, and Histopathological Morphological Characteristics. *Acta Dermatovenerol Croat*, 22(1):1-12,2014.
127. Greenwald HS. Superficial spreading and nodular melanoma are distinct biological entities: a challenge to the linear progression model. *Melanoma Res*, 22(1):1–8,2012.
128. Barnhill RL, Gupta K. Unusual variants of malignant melanoma. *Clinics in Dermatology*, 27:564–587,2009.
129. Magro CM, Crowson AN, Mihm MC. Unusual variants of malignant melanoma. *Modern Pathology* 19: 41–70,2006.
130. Gallagher SJ, Tiffen JC, Hersey P. Histone Modifications, Modifiers and Readers in Melanoma Resistance to Targeted and Immune Therapy. *Cancers*, 8;7(4):1959-82,2015.
131. Potrony M, Badenas C, Aguilera P, et al. Update in genetic susceptibility in melanoma. *Ann Transl Med*, 33;3(15):210,2015.
132. Park HS, Cho KH. Acral Lentiginous Melanoma in Situ: A Diagnostic and Management Challenge. *Cancers*, 2:642-652,2010.
133. Ali Z, Yousaf N, Larkin J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC Supplements*, 11:81 – 91,2013.
134. Ivan D, Prieto VG. An Update on Reporting Histopathologic Prognostic Factors in Melanoma. *Arch Pathol Lab Med*, 135:825-829,2011.
135. duPont G, Synnestvedt M, Elder DE, Schultz D. Lessons from Tumor Progression: The Invasive Radial Growth Phase of Melanoma Is Common, Incapable of Metastasis, and Indolent. *The journal of investigative dermatology*, 100(3):342-345,1993.
136. Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. *Modern Pathology*, 19:71–87,2006.
137. Teixidó C, González-Cao M, Karachaliou N, Rosell R. Predictive factors for immunotherapy in melanoma. *Ann Transl Med*, 66;3(15):208,2015.
138. Elder DE. The role of lymph node dissection for clinical stage I malignant melanoma of intermediate thickness (1.51-3.99 mm). *Cancer*, 56(2):413-418,1985.
139. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer immunity*, 9:3,2009.
140. De Unamuno B, Palanca S, Botella R. Update on melanoma epigenetics. *Curr Opin Oncol*, 22;27(5):420-6,2015.

141. Taylor RC, Patel A., Panageas KS, Busam KJ, Brady MS. Tumor-Infiltrating Lymphocytes Predict Sentinel Lymph Node Positivity in Patients With Cutaneous Melanoma. *The journal of clinical oncology*, 25(7): 869-875,2007.
142. Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, et al. Tumor-Infiltrating Lymphocyte Grade Is an Independent Predictor of Sentinel Lymph Node Status and Survival in Patients With Cutaneous Melanoma. *The journal of clinical oncology*, 30(21):2674-2683,2012.
143. Requena C, Botella-Estrada R, Traves V, et al. Problems in Defining Melanoma Regression and Prognostic Implication. *Actas Dermosifiliogr*, 100:759-66,2009.
144. Guitart J, Lowe L, Piepkorn M, et al., Histological characteristics of metastatizing thin melanomas. *Arch.Dermatol*, 138: 603-608,2002.
145. Homs J, Kashani-Sabet M, Messina JL, Daud A. Cutaneous Melanoma: Prognostic Factors. *Cancer control*, 12(4):223-229,2005.
146. Maurichi A, Miceli R, Camerini T. Prediction of survival in patients with thin melanoma: results from a multi-istitution study. *Journal of clinical oncology*, 32(23):2479-2485,2014.
147. Pastushenko I, Vermeulen PB, Carapeto FJ, et al. Blood microvessel density, lymphatic microvessel density and lymphatic invasion in predicting melanoma metastases: systematic review and meta-analysis. *British Journal of Dermatology*, 170:66–77,2014.
148. Balch CM, Gershenwald JE. Multivariate Analysis of Prognostic Factors Among 2,313 Patients With Stage III Melanoma: Comparison of Nodal Micrometastases Versus Macrometastases. *Journal of clinical oncology*, 28(14):2452-2459,2010.
149. deVries E. Superior survival of females among 10 538 Dutch melanoma patients is independent of Breslow thickness, histologic type and tumor site. *Annals of Oncology*, 19:583–589,2008.
150. Balch CM, Soong S, Gershenwald JE, et al. Age as a Prognostic Factor in Patients with Localized Melanoma and Regional Metastases. *Ann.Surg.Oncol*, 20(12):3961–3968,2013.
151. Dickson PV, Gershenwald JE. Staging and Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Surg Oncol Clin N Am*, 20(1): 1–17,2011.
152. Vereecken P, Awada A, Suci S, Castro G. Evaluation of the prognostic significance of serum galectin-3 in American Joint Committee on Cancer stage III and stage IV melanoma patients. *Melanoma research*, 19(5):316-320,2009.
153. Vereecken P. Serum Markers in Clinical Management of Malignant Melanoma. Highlights in Skin Cancer, Dr. Pierre Vereecken (Ed.), ISBN: 978-953-51-1073-6, InTech, 2013. Available at <http://www.intechopen.com/books/highlights-in-skin-cancer>.
154. Picard M. Is BRAF a prognostic factor in stage III skin melanoma? A retrospective study of 72 patients after positive sentinel lymph node dissection. *British journal of dermatology*, 171(1):108–114,2014.
155. Jakob JA, Bassett RL, Casen G, et al. NRAS Mutation Status is an Independent Prognostic Factor in Metastatic Melanoma. *Cancer*, 118(16):4014–4023,2012.
156. Shan-Shan J, De-Sheng W. Galectin-3 is associated with a poor prognosis in primary hepatocellular carcinoma. *Journal of Translational Medicine*, 12:273,2014.
157. Comodo AN, Lacerda A, Bachi L, et al. Galectin-3 expression favors metastasis in murine melanoma. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4: 55-62,2013.

158. Dange MC, Srinivasan N, More SK, et al. Galectin-3 expressed on different lung compartments promotes organ specific metastasis by facilitating arrest, extravasation and organ colonization via high affinity ligands on melanoma cells, *Clin Exp Metastasis*, 31(6):661-73,2014.
159. Raskin L. Transcriptome Profiling Identifies HMGA2 as a Biomarker of Melanoma Progression and Prognosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 133: 2585–2592,2013.
160. Sun V, Zhou WB, Majid S, Kashani-Sabet M, Dar AA. MicroRNA-mediated regulation of melanoma. *British Journal of Dermatology*, 171:234–241,2014.
161. Khosravi S. Role of EIF5A2, a downstream target of Akt, in promoting melanoma cell invasion. *British Journal of Cancer*, 110: 399–408,2014.
162. deSemir D. Pleckstrin homology domain-interacting protein (PHIP) as a marker and mediator of melanoma metastasis. *PNAS*, 109(18): 7067–7072, 2012.
163. Gerber AL. High expression of FOXP3 in primary melanoma is associated with tumour progression. *British journal of dermatology*, 170: 103–109,2014.
164. Rigel DS, Russak J, Friedman R. The Evolution of Melanoma Diagnosis: 25 Years Beyond the ABCDs. *Cancer J Clin*, 60:301–316,2010.
165. Moloney FJ, Guitera P, Coates E, et al. Detection of Primary Melanoma in Individuals at Extreme High Risk A Prospective 5-Year Follow-Up Study. *JAMA Dermatol*, 150(8):819-27,2014.
166. Losina E, Walensky RP, Geller A, et al. Visual Screening for Malignant melanoma: A Cost-effectiveness Analysis. *Arch Dermatol*, 143(1): 21–28,2007.
167. Buljan M, Šitum M, Tomas D, Milošević M, Krušlin B. Prognostic value of galectin-3 in primary cutaneous melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 25(10):1174-81, 2011.
168. Alarcon I, Carrera C, Palou J, Alos L, Malveyh J, Puig S. Impact of in vivo reflectance confocal microscopy on the number needed to treat melanoma in doubtful lesions. *British Journal of Dermatology*, 170:802–808,2014.
169. McFarland SL, Schram SE. Physician skin examinations for melanoma screening. *Cutis*, 96(3):175-82,2015.
170. NCCN guidelines, melanoma, version 1.2014. Available at :https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp.
171. Ritterhouse LL, Barletta JA. BRAF V600E mutation-specific antibody: A review. *Semin Diagn Pathol*, 5;32(5):400-8,2015.
172. Mandalà M, Rossi CR, DeGiorgi V, et al. Il melanoma. In: La medicina oncologica, diagnosi, terapia e gestione clinica. Prima edizione, Elsevier, 2014.
173. Trotter SC, Sroa N, Winkelman RR, Olencki T, Bechtel M. A Global Review of Melanoma Follow-up Guidelines. *The journal of clinical and aesthetic dermatology*, 6(9):18-26,2013.
174. Ross MI, Gershenwald JE. Sentinel lymph node biopsy for melanoma: A critical update for dermatologists after two decades of experience. *Clinics in Dermatology*, 31,298–310,2013.
175. Zhu G, Zhang X, Wang Y et al. Prognostic value of melanoma cell adhesion molecule expression in cancers: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*, 15;8(8):12056-63,2015.
176. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ et al. Final Trial Report of Sentinel-Node Biopsy versus Nodal Observation in Melanoma. *N Engl J Med*, 370(7):599–609,2014.
177. Nakamura Y, Otsuka F. Sentinel Lymph Node Biopsy for Melanoma and Surgical Approach to Lymph Node Metastasis, Melanoma - From Early Detection to Treatment, Dr. Ht Duc (Ed.), ISBN: 978-953-51-

- 0961-7, InTech, 2013. Available at: <http://www.intechopen.com/books/melanoma-from-early-detection-to-treatment/sentinel-lymph-node-biopsy-for-melanoma-and-surgical-approach-to-lymph-node-metastasis>.
- 178.van der Ploeg APT, van Akkooi ACJ. The prognostic significance of sentinel node tumour burden in melanoma patients: An international, multicenter study of 1539 sentinel node-positive melanoma patients. *European journal of cancer*, 50:111-120,2014.
- 179.van Akkooi ACJ, deWilt JHW, Verhoef C, et al. Clinical relevance of melanoma micrometastases (<0.1 mm) in sentinel nodes: are these nodes to be considered negative? *Annals of Oncology*, 17:1578–1585,2006.
- 180.Yao KA, Hsueh EC, Essner R, et al. Is Sentinel Lymph Node Mapping Indicated for Isolated Local and In-Transit Recurrent Melanoma? *Ann Surg*, 238:743–747,2003.
- 181.Coleman F, Andrew D. Optimizing Regional Infusion Treatment Strategies for Melanoma of the Extremities. *Expert review of anticancer therapy*, 9.11:1599. PMC,2009.
- 182.Dummer R, Mangana J. Long-term pegylated interferon- α and its potential in the treatment of melanoma. *Biologics: Targets & Therapy* 3:169–182,2009.
- 183..Sullivan RJ, Flaherty KT. Major therapeutic developments and current challenges in advanced melanoma. *British journal of dermatology*, 170:36-44,2014.
- 184.Fellner C. Ipilimumab (Yervoy) Prolongs Survival In Advanced Melanoma Serious Side Effects and a Hefty Price Tag May Limit Its Use. *Drug forecast*, 37(9):503-530,2012.
- 185.Lacouture ME, Wolchok JD, Yosipovitch G et al. Ipilimumab in patients with cancer and the management of dermatologic adverse events. *J Am Acad Dermatol*, 71:161-9,2014.
- 186.Thumar J, Shahbazian D, Aziz SA, et al. MEK targeting in N-RAS mutated metastatic melanoma. *Molecular Cancer*, 13:45,2014.
- 187.Savoia P, Fava P and Bernengo MG (2011). Cutaneous Metastases from Malignant Melanoma: Clinical Features and New Therapeutic Perspectives, Treatment of Metastatic Melanoma, Ms Rachael Morton (Ed.), ISBN: 978-953-307-574-7, InTech, 2011. Available at: <http://www.intechopen.com/books/howto-reference/melanoma-from-early-detection-to-treatment/management-of-in-transit-malignant-melanoma-clinical-features-and-new-therapeutic-perspectives>.
- 188.Paul J, Speicher F, Douglas S, Tyler H, Mosca JP (2013). Management of In-Transit Malignant Melanoma, Melanoma - From Early Detection to Treatment, Dr. Ht Duc (Ed.), ISBN: 978-953-51-0961-7, InTech, 2013. Available at: <http://www.intechopen.com/books/howto-reference/melanoma-from-early-detection-to-treatment/management-of-in-transit-malignant-melanoma>.
- 189.Kelly JW, Shen S, Pan Y, Dowling J., McLean CA. Postexcisional melanocytic regrowth extending beyond the initial scar: a novel clinical sign of melanoma. *British Journal of Dermatology*, 170:961–964,2014.
- 190.Trotter SC. A Global Review of Melanoma Follow-up Guidelines. *The journal of clinical and aesthetic dermatology*, 6(9):18-26,2013.
- 191.Mashima E, Inoue A, Sakuragi Y, et al. Nivolumab in the treatment of malignant melanoma: review of the literature. *Onco Targets Ther*, 6;8:2045-51,2015.
- 192.Schork NJ, Fallin D, Lanchbury S. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet*, 58:250–264,2000.

193. Ramensky V. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic acids research*, 30(17):3894-3900, 2002.
194. Yamaguchi-Kabata Y. Distribution and Effects of Nonsense Polymorphisms in Human Genes. *Plos one*, 3(10): e33-93, 2008.
195. Fareed M, Afzal M. Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: A tool for broad spectrum service. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 14, 123–134, 2013.
196. Meng XX, Yao M, Zhang XD, Xu HX, Dong Q. ER stress-induced autophagy in melanoma. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 66;42(8):811-6, 2015.
197. Scott LJ. Nivolumab: A Review in Advanced Melanoma. *Drugs*, 75(12):1413-24, 2015.
198. Stark M, Hayward N. Genome-Wide Loss of Heterozygosity and Copy Number Analysis in Melanoma Using High-Density Single-Nucleotide Polymorphism Arrays. *Cancer Res*, 67(6):2632–42, 2007.
199. Zhao N, Han JG, Shyu C, Korkin D. Determining Effects of Non-synonymous SNPs on Protein-Protein Interactions using Supervised and Semisupervised Learning. *PLoS Comput Biol*, 10(5):e1003592, 2014.
200. Chen R, Davydov EV, Sirota M, Butte AJ. Non-Synonymous and Synonymous Coding SNPs Show Similar Likelihood and Effect Size of Human Disease Association. *PLoS ONE*, 5(10): e13574, 2010.
201. Fearon ER. Human cancer syndromes, Clues to the origin and nature of cancer. *Science*, 278:1043-1050, 1997.
202. Wright RB, Clark DH, Milne JA. Malignant cutaneous melanoma: a review. *Br J Surg*, ;40(162):360-8. 1953
203. Antoniou AC, Chenevix-Trench G. Common genetic variants and cancer risk in Mendelian cancer syndrome. *Curr Opin Genet Dev*, 20(3):299-307, 2010.
204. Liu H, Wang LE, Liu Z, et al. GenOMEL Investigators et al. Association between functional polymorphisms in genes involved in the MAPK signaling pathways and cutaneous melanoma risk. *Carcinogenesis*, 34(4):885–892, 2013.
205. Debniak T, Scott RJ, Huzarski T et al. CDKN2A Common Variants and Their Association with Melanoma Risk: A Population-Based Study. *Cancer Res*, 65(3):835-839, 2005.
206. Bakos RM, Besch R, Zoratto GG et al. The CDKN2A p.A148T variant is associated with cutaneous melanoma in Southern Brazil. *Experimental Dermatology*, 20, 890–893, 2011.
207. Spica T. The A148T Variant of the CDKN2A Gene Is Not Associated with Melanoma Risk in the French and Italian Populations. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 1658–1660, 2006.
208. Bourillon A. Genetic variation at KIT locus may predispose to melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 26(1):88-96, 2013.
209. Ye S, Dhillon S, Turner SJ, Bateman AC. Invasiveness of Cutaneous Malignant Melanoma Is Influenced by Matrix Metalloproteinase 1 Gene Polymorphism. *Cancer research*, 61:1296–1298, 2001.
210. Cotignola J, Roy P. Functional polymorphisms in the promoter regions of MMP2 and MMP3 are not associated with melanoma progression. *Journal of Negative Results in BioMedicine*, 6: 9, 2007.
211. Cotignola J, Reva B, Mitra N, Ishill N. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) polymorphisms in patients with cutaneous malignant melanoma. *BMC Medical Genetics*, 8:10, 2007.
212. Law MH, Hayward NK. Melanoma Genetics: Recent Findings Take Us Beyond Well-Traveled Pathways. *Journal of Investigative Dermatology*, 132:1763–1774, 2012.

213. Law MH. Meta-Analysis Combining New and Existing Data Sets Confirms that the TERT–CLPTM1L Locus Influences Melanoma Risk. *Journal of Investigative Dermatology*, 132:485–487,2012.
214. Bodelon C, Pfeiffer RM, Bollati V, et al. On the Interplay of Telomeres, Nevi and the Risk of Melanoma. *PLoS ONE*, 7(12): e52466,2012.
215. Bafaloukos D, Gogas H. The treatment of brain metastases in melanoma patients. *Cancer Treat Rev*, 30(6):515-20,2004.
216. Robles-Espinoza CD, Harland M, Rams AJ, et al. POT1 loss-of-function variants predispose to familial melanoma. *Nature Genetics*, 46(5): 478-484,2014.
217. Li C, Yin M, Wang LE, et al. Polymorphisms of Nucleotide Excision Repair Genes Predict Melanoma Survival. *Journal of Investigative Dermatology*, 133:1813–1821,2013.
218. Fang S, Han J, Zhang M et al. Joint Effect of Multiple Common SNPs Predicts Melanoma Susceptibility. *PLoS ONE*, 8(12): e85642,2013.
219. Schultz J, Lorenz P, Ibrahim SM, et al. The Functional 443T/C Osteopontin Promoter Polymorphism Influences Osteopontin Gene Expression in Melanoma Cells via Binding of c-Myb Transcription Factor. *Molecular carcinogenesis*, 48:14–23,2009.
220. Yin M, Soikkeli J, Jahkola T, et al. Osteopontin Promotes the Invasive Growth of Melanoma Cells by Activating Integrin $\alpha v\beta 3$ and Down-Regulating Tetraspanin CD9. *The American Journal of Pathology*, 184(3): 842-858,2014.
221. Filia A, Newton-Bishop JA. Plasma osteopontin concentrations in patients with cutaneous melanoma. *Oncology reports*, 30:1575-1580,2013.
222. Guy R, Newell Y, Joanne G, et al. Incidence of Cutaneous Melanoma in the United States by Histology with Special Reference to the Face. *Cancer Research*, 48:5036-5041,1988.
223. Funari G, Menin C, Elefanti L, D'Andrea E, Scaini MC. Familial Melanoma in Italy: A Review. *Clinical and Research Perspectives*, 32;55-58,2011.
224. Zhai R, Zhao Y, Liu G, et al. Interactions between Environmental Factors and Polymorphisms in Angiogenesis Pathway Genes in Esophageal Adenocarcinoma Risk: A Case-Only Study. *Cancer*, 118(3):804–811,2012.
225. Li Y, Chang SC, Niu R et al. TP53 genetic polymorphisms, interactions with lifestyle factors and lung cancer risk: a case control study in a Chinese population. *BMC Cancer*, 13: 607,2013.
226. Stoutenburg JP, Schrope B, Kaufman HL. Adjuvant therapy for malignant melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 4(5):823-35,2004.
227. Lindstrom S, Schumacher F, Siddiq A et al. Characterizing Associations and SNP-Environment Interactions for GWAS-Identified Prostate Cancer Risk Markers—Results from BPC3, *PLoS ONE*, 6(2): e17142,2011.
228. Oh SY, Kwon HC, Kim SH, et al. The relationship of Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and clinical outcome in advanced gastric cancer patients treated with FOLFOX: VEGF polymorphism in gastric cancer. *BMC Cancer*, 13:43,2013.
229. Park JY, Amankwah EK, Anic GM, et al. Gene variants in angiogenesis and lymphangiogenesis and cutaneous melanoma progression. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 22(5):827–834,2013.
230. Kvaskoff M, Whiteman DC, Zhao ZZ, et al. Polymorphisms in naevus-associated genes MTAP, PLA2G6, and IRF4 and the risk of invasive cutaneous melanoma. *Twin Res Hum Genet*, 14(5):422–432,2011.

231. Narita N, Tanemura A, Murali R, et al. Functional RET G691S Polymorphism in Cutaneous Malignant Melanoma. *Oncogene*, 28(34):3058–3068,2009.
232. Sturm RA, Fox C, McClenahan P, et al. Phenotypic Characterization of Nevus and Tumor Patterns in MITF E318K Mutation Carrier Melanoma Patients. *Journal of Investigative Dermatology*, 134:141–149,2014.
233. Davies MA. The multi-faceted roles of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *Journal of Translational Medicine*, 13(Suppl 1):21,2015.
234. Curtin JA, Stark MS, Pinkel D, Hayward NK, Bastian BC. PI3-Kinase Subunits Are Infrequent Somatic Targets in Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 126:1660–1663,2006.
235. Manca A, Lissia A, Capone M, Ascierto PA, Botti G. Activating PIK3CA mutations coexist with BRAF or NRAS mutations in a limited fraction of melanomas. *Journal of Translational Medicine*, 13:37,2015.