



Consiglio Nazionale delle  
Ricerche



Ministero dell'Istruzione,  
dell'Università e della Ricerca



**BASI SCIENTIFICHE PER LINEE GUIDA**

**IL MELANOMA CUTANEO**

**GENNAIO 2000**

<http://www.progettooncologia.cnr.it/>  
<http://progettooncologia.cnr.it/>



## **COORDINATORE:**

*N. Cascinelli*

## **GRUPPO DI STUDIO:**

### *Epidemiologi:*

*S. Franceschi, Aviano*

### *Dermatologi:*

*T. Cainelli, Bergamo  
M. Cristofolini, Trento  
B. Giannotti, Firenze*

### *Patologi:*

*C. Clemente, Milano  
T. Faraggiana, Roma*

### *Biologi:*

*A. Anichini, Milano*

### *Chirurghi:*

*N. Cascinelli, Milano  
F. Di Filippo, Roma  
N. Mozzillo, Napoli  
A. Testori, Milano*

### *Oncologi Medici:*

*E. Bajetta (Milano)  
L. Celio (Milano)  
G. Comella (Napoli)  
M. Maio (Aviano)  
R. Ridolfi (Forlì)*

### *Medico di Medicina Generale:*

*N. Seminara (Treviso)*

## **SEGRETERIA SCIENTIFICA:**

*A. Costa (Milano)  
E. Garancini (Milano)*

## **GRUPPO DI CONSENSO:**

### ***Epidemiologi:***

***P. Pasquini (Roma)***  
***R. Zanetti (Torino)***

### ***Dermatologi:***

***M.G. Bernengo (Torino)***  
***E. Bertani (Varese)***  
***P. Carli (Firenze)***  
***C. Catricalà (Roma)***  
***V. Dal Pozzo (Milano)***  
***G. Landi (Cesena)***  
***M. Lospalluti (Bari)***

### ***Patologi:***

***A. Carbone (Aviano)***  
***G. De Rosa (Napoli)***  
***L. Marasà (Palermo)***  
***M.C. Mihm (Boston)***  
***V. Ninfo (Padova)***

### ***Biologi:***

***P.G. Natali (Roma)***

### ***Chirurghi:***

***F. Belli (Milano)***  
***R. Cavaliere (Roma)***  
***D. Civalleri (Genova)***  
***G. Micali (Catania)***  
***M. Pace (Firenze)***  
***C. Rossi (Aviano)***  
***C.R. Rossi (Padova)***  
***M. Santinami (Milano)***  
***A. Santoro (Milano)***  
***M. Vaglini (Milano)***

### ***Oncologi Medici:***

***A.R. Bianco (Napoli)***  
***G. Cocconi (Parma)***  
***F. De Braud (Milano)***  
***M. De Lena (Bari)***  
***E. Galligioni (Trento)***  
***R. Labianca (Bergamo)***  
***G. Mantovani (Cagliari)***  
***A. Paccagnella (Venezia)***  
***A. Romanini (Pisa)***  
***M.R. Sertoli (Genova)***

## PREFAZIONE

L'interesse e il successo suscitati dalla pubblicazione di volumi sulle "Basi Scientifiche per la Definizione di Linee Guida in Ambito Clinico", relative ai tumori della mammella, colon-retto, polmone, prostata, utero-ovaio, alle patologie pediatriche e recentemente ai tumori epiteliali della testa e del collo ha indotto, su richiesta e pressione da parte di molti specialisti del settore, a produrre un'opera analoga per i melanomi cutanei.

È così che questa iniziativa, sorta nell'ambito del Progetto Finalizzato del CNR "Applicazioni Cliniche della Ricerca Oncologica (ACRO)", è stata responsabilmente portata avanti anche dopo la conclusione del suddetto progetto e in attesa dell'avvio del Progetto Finalizzato ACRO di II generazione.

Questa opera, frutto dell'esperienza e dell'impegno gratuito dei più importanti specialisti interdisciplinari del settore, rappresenta una trattazione, ci auguriamo adeguatamente esauriente anche se volutamente sintetica, degli aspetti epidemiologici e fattori di rischio e degli aspetti genetici e immunologici determinanti sulla predisposizione, insorgenza ed evoluzione della malattia, oltre a fornire indicazioni sul corretto approccio diagnostico ed un'analisi critica delle strategie terapeutiche ritenute attualmente valide.

L'opera, analogamente a quelle precedenti, non trascura di formulare direttive future sulle ricerche da perseguire nei settori di prevenzione e diagnosi, immunologia e ricerca di base e infine in quello della terapia nelle sue forme più innovative, ricerche che si auspica possano trovare presto spazio e supporto nell'atteso Progetto Finalizzato ACRO di II generazione.

L'opera, risultato di un'interazione tra il Gruppo di Studio composto da 17 esperti e dal Gruppo di Consenso composto da 35 esperti viene messa a disposizione del Ministero della Sanità, come base per la produzione di linee guida operative di cui l'oncologia ha bisogno per svilupparsi in modo uniforme e qualificato su tutto il territorio nazionale, degli Assessori regionali e dei Medici di Base.

Al Presidente del CNR, prof. Lucio Bianco, che, pure in un delicato momento di riforma dell'Ente, ha dimostrato sensibilità per la pubblicazione e diffusione della presente opera e al Ministro dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica, onorevole Ortensio Zecchino, al quale chiediamo un incisivo intervento per l'attivazione del PF ACRO II, consegniamo questa opera.

<b>Natale Cascinelli</b>	<b>Rosella Silvestrini</b>
Direttore Scientifico	Presidente Comitato di Progetto
Istituto Nazionale Tumori	Progetto Finalizzato ACRO-CNR
Milano	

# INDICE

1. **EPIDEMIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO**
  - 1.1 **Appendice**
2. **BIOLOGIA**
  - 2.1 **Genetica**
  - 2.2 **Immunologia**
3. **DIAGNOSI DELLA LESIONE PRIMARIA**
  - 3.1 **Addendum**
4. **DIAGNOSI DELLA MATASTASI (STADIAZIONE)**
5. **TRATTAMENTO**
6. **DIRETTIVE FUTURE**

# 1. EPIDEMIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO

## EPIDEMIOLOGIA DEL MELANOMA CUTANEO IN ITALIA

Negli anni Novanta si stima che annualmente, a livello mondiale, si verifichino circa **100.000 nuovi casi** di melanoma cutaneo (circa il 15% in più che nel decennio precedente) (1). Ciò corrisponde a circa 1% del totale dei tumori maligni. Il tumore è decine di volte più frequente nei soggetti caucasici che nelle altre razze. L'incidenza del melanoma varia, tuttavia, anche all'interno delle popolazioni bianche: da valori attorno al 2 per 100.000 abitanti all'anno (tasso standardizzato sulla popolazione mondiale, come i successivi) in Spagna ed in America Latina a valori intorno a 20 o più per 100.000 in Australia. I tassi di incidenza più elevati si riscontrano in aree molto soleggiate abitate da popolazioni originarie del Nord Europa con pelle chiara (es. oltre all'Australia, le Hawaii, ed Israele) (2).

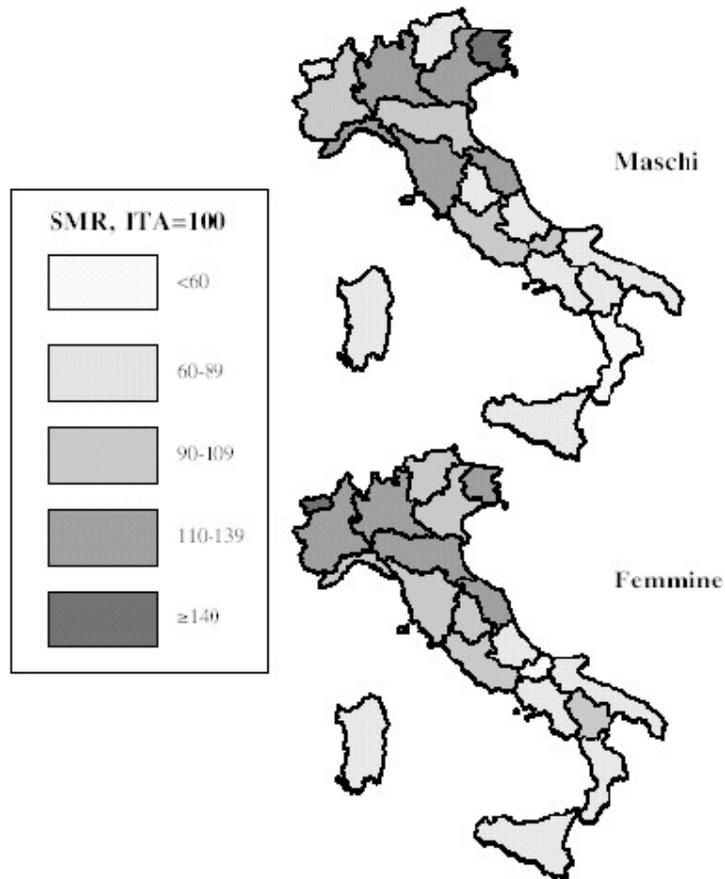
Per illustrare l'epidemiologia del melanoma si considereranno principalmente i tassi di mortalità ed incidenza per questo tumore negli ultimi trent'anni circa e, tra i fattori di rischio, quelli endogeni (le caratteristiche fenotipiche degli individui, i nevi, e la predisposizione familiare) ed esogeni (esposizione al sole) meglio studiati. Negli ultimi decenni sono stati condotti circa quaranta studi, per lo più di tipo caso-controllo, su tali argomenti e pertanto, ogni qual volta disponibili, si privilegeranno le analisi combinate (pooled analysis). Queste forniscono, infatti, una sintesi della maggior parte delle conoscenze disponibili ed una quantificazione più precisa delle associazioni in esame. Come di consueto negli studi di epidemiologia, la misura dell'associazione sarà espressa in termini di **rischio relativo** (RR), che indica in che misura la caratteristica o l'esposizione in esame aumenta il rischio di base di una malattia.

## IL MELANOMA IN ITALIA E IN EUROPA

In Italia la stima del numero di melanomi e dei decessi ad esso attribuibili è approssimativa. Per quanto concerne la mortalità, sulla base della documentazione disponibile nel territorio nazionale, esiste una difficoltà a distinguere, a livello di certificati di morte, il melanoma (3) dagli altri tumori maligni della pelle (codice 173). È d'aiuto lo studio per fasce d'età, essendo un decesso per tumore cutaneo non di tipo melanoma molto improbabile al di sotto dei 45 anni, e abbastanza raro al di sotto dei 65.

Nell'ultimo quinquennio (1990-94), in Italia i decessi attribuibili esplicitamente a melanoma sono stati 3178 nei maschi e 2807 nelle femmine, corrispondenti rispettivamente a tassi di mortalità standardizzati di **1,5 e 1,1 per 100.000 abitanti**. La mortalità nelle regioni settentrionali è circa il doppio di quella registrata nelle regioni meridionali, sia nei maschi che nelle femmine (Figura 1).

**Figura 1. Rapporto Standardizzato di Mortalità (SMR) per il melano ma cutaneo nelle varie Regione Italiane per sesso 1990-94 (4)**



A queste 5985 morti deve essere aggiunta una quota dei decessi attribuiti ad altri e non meglio specificati tumori cutanei (1339 maschi e 989 femmine) (4). Tra il quinquennio 1970-74 ed il 1990-94 i decessi in Italia sono aumentati di circa 4.000 unità mentre il tasso standardizzato di mortalità, nei maschi, è aumentato da 0,6 a 1,5 per 100.000 abitanti e nelle femmine da 0,4 a 1,1 per 100.000 abitanti (5). Il numero di nuovi casi di melanoma, in Italia, nel 1990, valutato secondo il metodo descritto in Parkin et al. (1), è stato stimato attorno ai 1300 maschi e 1700 femmine, che corrispondono a tassi di incidenza di **3,6 e 4,1 per 100.000** abitanti all'anno (6). Rilevazioni precise, a livello delle aree coperte da Registri Tumori di popolazione, suggeriscono, però, punte di incidenza superiori a 9 per 100.000 abitanti, in ambedue i sessi, a Trieste, e superiori al 5-6 per 100.000 a Genova, in Veneto e in Romagna (7) (Tabella 1). Il rischio cumulativo di sviluppare un melanoma entro i 75 anni di età oscilla, perciò tra meno di 0,4%, nelle province di Latina e Ragusa, a circa 1% in quella di Trieste (media nazionale intorno allo 0,5%).

La Figura 2 mostra i tassi di mortalità ed incidenza per melanoma cutaneo in Italia nell'ambito dei tassi corrispondenti registrati negli

altri Paesi dell'Unione Europea. Si evidenziano livelli intermedi tra quelli più elevati riscontrati nei Paesi dell'Europa del Nord e quelli inferiori in Grecia e Portogallo (8).

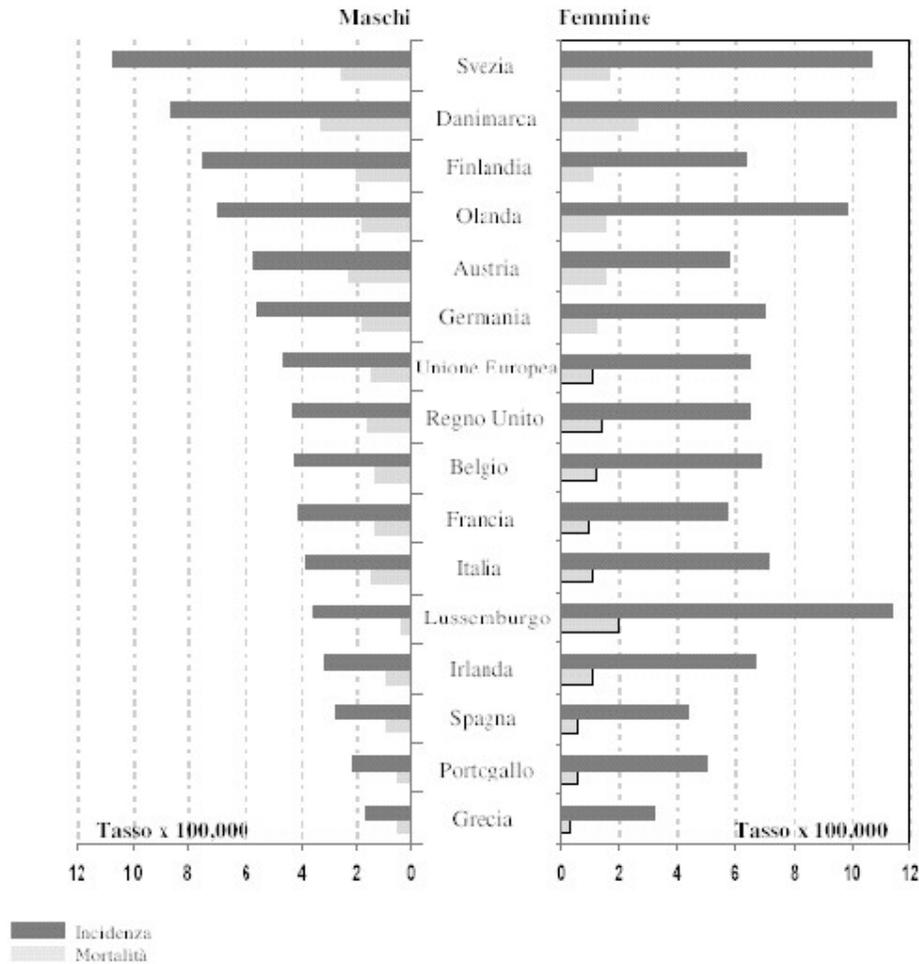
**Tabella 1. Tassi di incidenza per 100.000 e rischio cumulativo per cento di melanoma cutaneo in 13 Registri Tumori in Italia, 1988-92 (7)**

	Tasso grezzo		Tasso standardizzato mondiale		Rischio cumulativo 0-74	
	M	F	M	F	M	F
Torino	6.1	8.5	4.0	5.0	0.4	0.5
Genova	7.7	9.0	5.2	5.8	0.5	0.5
Varese	7.0	7.8	5.0	5.0	0.5	0.5
Veneto	8.5	9.9	5.9	7.0	0.6	0.7
Trieste	17.3	17.2	9.6	9.9	1.1	0.9
parma	6.7	7.6	4.2	4.9	0.5	0.5
Modena	6.9	5.5	4.4	3.7	0.5	0.4
Ferrara	5.5	7.4	3.5	6.1	0.4	0.5
Forli-Ravenna	9.1	10.9	5.9	6.7	0.6	0.7
Macerata	9.9	8.3	6.0	4.9	0.7	0.5
Firenze	8.4	8.6	5.6	5.3	0.6	0.6
Latina	3.9	3.7	3.3	2.8	0.4	0.3
Ragusa	5.7	3.3	3.9	2.3	0.4	0.2

## **ANDAMENTO NEL TEMPO DELL'INCIDENZA E DELLA MORTALITÀ**

Tra il 1960 e la fine degli anni Ottanta, l'incidenza del melanoma cutaneo nelle popolazioni europee o di origine europea è aumentata ad un ritmo del 37% all'anno. Incrementi si sono riscontrati anche in Giappone, ma non a livello delle poche popolazioni non caucasiche (es. alcune aree dell'India e dell'Africa) per le quali esistono dati di incidenza affidabili (2).

**Figura 2. Tassi standardizzati per età (nella popolazione mondiale) dei casi di melanoma cutaneo nei vari paesi europei per sesso, 1990 (8)**



Un confronto degli andamenti dell'incidenza e della mortalità negli ultimi trent'anni mostra due scenari principali: 1) il più comune, un **incremento** costante nei tassi totali di incidenza con un rallentamento o arresto dell'aumento di quelli di mortalità nei gruppi di età più giovani a partire dalla metà degli anni Ottanta (es. in Italia, Danimarca, Gran Bretagna, Canada e gran parte degli Stati Uniti) (9) e 2) un **rallentamento o cessazione** degli aumenti anche per l'incidenza nei gruppi di età più giovani nei Paesi a rischio più elevato (es. in Australia, Nuova Zelanda, e Hawaii) (2).

A livello delle diverse sedi anatomiche, l'aumento dell'incidenza è stato massimo per i melanomi del tronco e minimo per quelli della testa e del collo mentre, per quelli degli arti inferiori, gli incrementi sono stati più marcati nel sesso femminile.

Per l'ultimo decennio si hanno informazioni sugli andamenti in funzione dello spessore del melanoma. Queste suggeriscono un maggior aumento dei tassi di incidenza dei melanomi sottili rispetto a

quelli più spessi (2). Miglioramenti diagnostici sono, perciò, alla base di parte degli aumenti di incidenza riscontrati, soprattutto negli ultimi 10-20 anni. Tuttavia, gli incrementi, pur più modesti, nei tassi di mortalità testimoniano che il melanoma cutaneo è effettivamente aumentato nelle popolazioni europee o di origine europea e che le recentissime flessioni nella mortalità, soprattutto nei giovani, sono ascrivibili ai primi risultati favorevoli della diagnosi precoce. In alcune popolazioni a rischio molto elevato (es. Australia) l'appiattimento dell'andamento dell'incidenza di melanoma nei giovani suggerisce che l'epidemia di melanoma registrata negli ultimi decenni si sta finalmente attenuando.

## SOPRAVVIVENZA IN SERIE NON SELEZIONATE

Uno studio eseguito in 17 Paesi europei (45 registri dei tumori) su oltre 16.000 nuovi casi di melanomi cutanei diagnosticati tra il 1978 ed il 1992 permette di valutare la sopravvivenza per questo tumore su base di popolazione (cioè di una serie non selezionata) (10). La sopravvivenza relativa (confrontata cioè con quella di una popolazione uguale per sesso ed età, ma indenne da melanoma) a cinque anni è leggermente più elevata nelle donne (81%) che negli uomini (68%), ma presenta variazioni notevoli nei diversi Paesi. Essa oscilla, infatti, tra il 54% in Polonia e l'89% in Svizzera. Tra il 1978 ed il 1989 si è riscontrato un aumento della sopravvivenza a cinque anni di circa il 10% e una riduzione della differenza tra uomini e donne. Risultando la profondità di invasione della diagnosi di melanoma il principale fattore prognostico, è molto probabile che gli aumenti riscontrati nella sopravvivenza siano soprattutto dovuti a miglioramento e/o anticipazione diagnostici.

In particolare, in Italia, la sopravvivenza relativa per melanomi diagnosticati tra il 1985 ed il 1989 è del **55%** negli uomini e del **78%** nelle donne, nonché del 78% nei soggetti di età compresa tra 15 e 44 anni, ma del 52% nei soggetti di 75 o più anni (10).

## PREVALENZA

La prevalenza (frequenza, espressa come numero assoluto e come proporzione delle persone che in qualsiasi momento del passato hanno avuta diagnosticata la malattia) è, insieme all'incidenza, il più importante indicatore del carico di patologia in una popolazione. Il dato è utile alla programmazione sanitaria, ad esempio a dimensionare le risorse necessarie a programmi di follow-up.

L'Italia è tra i pochi Paesi a disporre di misure di prevalenza, prodotte dalla rete dei Registri Tumori (11). Negli uomini il tasso di prevalenza dei melanomi (per 100.000 abitanti) è di 48.4, nelle donne di 101.6. Si tratta di valori di un ordine di grandezza superiori a quelli dell'incidenza. La divaricazione tra i sessi è spiegata dalla maggior incidenza e miglior sopravvivenza in quello femminile. Parimenti, all'interno del Paese, le differenze geografiche riflettono quelle osservate nell'incidenza e sopravvivenza: il valore della prevalenza è triplo in Veneto ed in Emilia rispetto alla Sicilia.

## FATTORI DI RISCHIO ENDOGENI

### ***Pigmentazione***

La relazione tra rischio di melanoma cutaneo ed alcune caratteristiche fenotipiche delle popolazioni e degli individui è nota da tempo. Una recente analisi globale dei dati ottenuti da 10 studi caso-controllo sull'argomento, per un totale di oltre 3.000 casi di melanoma e quasi 4.000 controlli sani, offre la più precisa quantificazione dei rischi relativi per le principali caratteristiche di pigmentazione (12). In confronto ad individui con capelli neri o castano scuro, quelli con capelli castano chiaro, biondi, o rossi presentano RR del 50-100% più elevati. Il rischio più elevato negli individui con occhi azzurri rispetto a quelli con occhi marroni perde significatività, dopo aggiustamento per il colore dei capelli e la presenza di efelidi. Inoltre, una carnagione chiara è associata ad un rischio circa doppio anche dopo aggiustamento per il colore dei capelli e degli occhi (12). I RR sovramenzionati non variano sostanzialmente in relazione al tipo istologico del melanoma (diffusione superficiale, nodulare, o lentigo maligna).

La presenza di numerose macchie solari comporta invece aumenti di circa due volte del rischio di melanoma superficiale e nodulare e di cinque volte per la lentigo maligna. Tale aumento di rischio sembra largamente indipendente da pigmentazione e numero di nevi (vedi di seguito). L'associazione diretta tra densità di macchie solari e melanoma tende ad essere più forte nei soggetti giovani che in quelli anziani (12).

### ***Nevi***

A parte l'età e la razza, il numero di nevi è il più importante fattore di rischio conosciuto per l'insorgenza del melanoma cutaneo (2). Numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato un rapido aumento del rischio di melanoma cutaneo con il crescere del numero di nevi. In un recente studio condotto su oltre 700 pazienti con melanoma e 1.000 individui sani (13) il rischio di melanoma cutaneo è apparso fortemente legato al numero sia di nevi piccoli (<5 mm) che di nevi superiori a 5 mm, ma non displastici e non a quello di nevi congeniti. La presenza di un nevo clinicamente atipico comporta un rischio relativo di oltre il doppio, mentre 10 o più di essi sembrano conferire un rischio 12 volte più elevato, dopo aggiustamento per caratteristiche fenotipiche e presenza di macchie solari e nevi non displastici.

## **FATTORI DI RISCHIO ESOGENI**

### ***Esposizione al sole***

L'esposizione al sole è considerata la principale causa del melanoma cutaneo (14). Ne sono prova la distribuzione del melanoma a livello mondiale, gli andamenti globali e per sede anatomica nel tempo nonché la recente dimostrazione, in melanomi, di lesioni del DNA specificamente indotte da radiazioni ultraviolette (UV). Tuttavia, la relazione tra sole e melanoma è assai complessa. Gli studi epidemiologici sull'argomento soffrono, inoltre, della difficoltà di valutare il tipo e la quantità di esposizione al sole nell'arco dell'intera

vita e di distinguere l'effetto del sole per se da quello della reazione di ciascun individuo al sole (es. fototipo e tendenza a sviluppare nevi).

Anche per la relazione tra esposizione al sole e melanoma è stata recentemente condotta un'analisi globale dei risultati ottenuti in 29 studi caso-controllo, per un totale di quasi 7.000 casi di melanoma (15). Globalmente è stata evidenziata un'associazione positiva con l'**esposizione intermittente al sole** (con un aumento del 70% per la categoria massima di esposizione ricreazionale) e un'associazione negativa con l'esposizione al sole di tipo occupazionale. I RR derivanti da un'anamnesi positiva per ustioni solari sono significativi sia per quelle verificatesi nell'infanzia, che nell'adolescenza o a qualsiasi età.

Dunque, la maggioranza dei dati finora raccolti sull'argomento indica che il melanoma è specificatamente correlato con un'esposizione al sole intermittente, di cui le ustioni solari rappresentano plausibilmente un buon indicatore (15, 16). Tale associazione presenta notevoli analogie con quella suggerita per il carcinoma basocellulare della cute, ma non con quella identificata per il carcinoma spinocellulare, per il quale il fattore più importante è rappresentato dall'esposizione cronica totale al sole (2).

Le modalità con cui l'esposizione intermittente al sole aumenta il rischio di melanoma non sono del tutto chiare. Diversi dati suggeriscono che il sole è importante per l'induzione e, forse, per la trasformazione dei nevi.

### **Fotoprotezione**

È dimostrato che l'esposizione alla radiazione UV solare può provocare danni alla pelle (fotoinvecchiamento e tumori cutanei) e agli occhi (fotocheratoconguntiviti, cataratta, ecc.). Per contro, essa produce almeno un beneficio: la produzione endogena di vitamina D3. La radiazione UV presente al suolo è composta per circa il 95% di UV-A e per il 5% circa di UV-B. L'intensità della radiazione UV varia con la stagione, la latitudine, l'altitudine e l'ora del giorno. Alle nostre latitudini, il 60% circa delle radiazioni UV è presente nelle quattro ore centrali rispetto a mezzogiorno (o 13 con l'ora legale). Esistono due componenti della radiazione UV, una **diretta** e l'altra **diffusa** responsabile, ad esempio, dell'abbronzatura sotto l'ombrellone. Foschia e nubi diminuiscono la radiazione infrarossa visibile, ma non la radiazione UV, che è "fredda".

Delle tre regioni spettrali della radiazione UV (A, B, e C), la radiazione UV-A è 100-1.000 volte meno efficace di quella UV-B ad indurre effetti a breve termine (es. eritema). Viceversa, quella UV-A risulta, per la sua maggior penetrazione, più attiva di quella UV-B nell'indurre il fotoinvecchiamento della pelle. Anche la radiazione UV-A (es. lettini e lampade abbronzanti), con o senza fotosensibilizzanti (es. psoraleni), è associata ad un aumento del rischio di melanoma (14). L'esposizione, o dose radiante, accumulata da un individuo nella vita dipende in larga misura dalla durata dell'esposizione al sole, dal periodo prescelto per esporsi, e dall'uso di indumenti coprenti e creme solari. L'influenza delle creme solari con filtri anti-UV-B e anti UV-A sulla probabilità di sviluppare un melanoma non è ancora ben definita. Mentre soprattutto le creme ad alto fattore di protezione

(17) diminuiscono il rischio di cheratosi solari, sette studi caso-controllo sull'argomento, per un totale di più di 2.500 casi e quasi 4.000 controlli (17), suggeriscono globalmente un'assenza di relazione tra uso di creme solari e rischio di melanoma. Esistono, però, grandi variazioni da studio a studio.

Uno studio prospettico europeo su 631 bambini tra 6 e 7 anni d'età (18) suggerisce che indossare indumenti coprenti è efficace a diminuire lo sviluppo di nevi del tronco, mentre l'uso di creme solari di qualunque fattore di protezione è associato ad un maggior numero di nevi. Poiché un alto numero di nevi è un forte predittore del rischio di melanoma, se ne deduce che i filtri solari possono esercitare un effetto sfavorevole sull'insorgenza di tale neoplasia, facilitando l'esposizione intermittente al sole in soggetti di pelle chiara senza il rischio di ustioni solari.

In conclusione, nonostante resti molto difficile distinguere l'importanza dell'uso di filtri solari da quello di altri fattori predisponenti al melanoma (es. fototipo, esposizioni solari intense, ecc.), non esiste, in questo momento, alcuna certezza che le creme solari possano costituire precauzioni di efficacia confrontabile con quella delle precauzioni tradizionali (cioè, evitare il sole nelle ore centrali della giornata e indossare cappelli ed indumenti protettivi). Pertanto, l'uso delle creme antisolari deve far parte di una strategia complessiva che tenga conto dell'uso di indumenti adeguati e dell'importanza di evitare esposizioni nelle ore centrali della giornata, soprattutto per le categorie a rischio.

Infine, l'assottigliamento dello strato di ozono stratosferico ha suscitato di recente notevole attenzione per le possibili conseguenze di questo fenomeno sul rischio di tumori cutanei. Nonostante il problema sia rilevante per il suo impatto sul clima e su vari ecosistemi, la modesta riduzione dello strato di ozono, registrata in limitati periodi dell'anno alle nostre latitudini, è trascurabile nei confronti del rischio di melanoma. L'eccessiva sottolineatura degli effetti sanitari associati alle variazioni dell'ozono rispetto al melanoma costituisce, attualmente, un potenziale elemento di confusione e, perciò, poco utile dal punto di vista preventivo (es. nei centri urbani concentrazioni di ozono nell'aria superiori ai limiti stabiliti causano allarme).

## **PREVENZIONE PRIMARIA: CAMPAGNE DI EDUCAZIONE SANITARIA**

Il rischio di sviluppare un melanoma è legato a fattori genetici ed a fattori ambientali. Allo stato attuale delle conoscenze l'eccessiva esposizione alla luce solare risulta essere il fattore ambientale più importante nell'insorgenza del melanoma. L'alto numero di nevi, fattore importante di rischio geneticamente determinato è influenzato dall'eccessiva esposizione solare (19-22).

L'azione carcinogenetica delle radiazioni solari è ben documentata soprattutto per i tumori epiteliali nelle popolazioni geneticamente predisposte. Queste popolazioni sono composte in gran parte da soggetti "melano-compromessi" che presentano capelli rossi, occhi

azzurri, efelidi, carnagione chiara e hanno scarsa capacità ad abbronzare e suscettibilità alle scottature (cute 1 e 2 di Fitzpatrick) (Tabella 2).

**Tabella 2. Non tutte le persone reagiscono allo stesso modo al sole**

I 6 fototipi

1. Capelli biondo-rossi, occhi chiari, carnagione molto chiara con efelidi, estremamente sensibile, si scotta sempre al sole e non si abbronza.
2. Capelli biondi, castano-chiari, occhi chiari, carnagione chiara, spesso con efelidi, sensibile, reagisce quasi sempre a forti esposizioni e si abbronza leggermente.
3. E' il tipo più frequente: capelli castani, carnagione bruno-chiara, occhi chiari o scuri, reagisce a volte ai colpi di sole, abbronzatura pronunciata.
4. Capelli castano-scuro o neri, carnagione da olivastra a scura, occhi scuri, pelle poco sensibile, reagisce raramente ai colpi di sole e si abbronza sempre.
5. Capelli neri, carnagione bruno-olivastra che non reagisce al sole.
6. Capelli neri, carnagione nera, tipo razza negra

Il rischio di melanoma è particolarmente alto se l'eccessiva esposizione avviene in età giovanile: una corretta prevenzione primaria deve essere impostata fin dalla nascita. In una popolazione come la nostra formata da soggetti con fototipo 3 e 4 i messaggi devono essere improntati al buon senso e devono essere indirizzati a sostituire il concetto di esposizione solare fine a se stessa e dell'abbronzatura a tutti i costi con il piacere di stare all'aria aperta e il principio di evitare i danni del sole. Più incisivo e mirato deve essere il messaggio indirizzato ai soggetti predisposti che pur non dovendo generare eccessiva ansia, deve indicare i reali rischi connessi con l'esposizione solare: dalle scottature all'invecchiamento cutaneo ed all'insorgenza di tumori della pelle. Possono essere consigliate creme solari ad alta protezione che per essere efficaci devono essere applicate più volte nella giornata, essere resistenti all'acqua e alla traspirazione e contenere filtri per raggi UVA e UVB. Le creme con soli filtri UVB infatti riducendo le scottature favoriscono le esposizioni prolungate che aumentano il rischio di tumori. Data l'incertezza sulla reale efficacia nel prevenire i tumori delle creme con filtri solari è necessario insistere sulla fotoprotezione da attuare con indumenti, cappelli con visiera, camicie, magliette, occhiali ed evitando l'esposizione al sole nelle ore centrali della giornata.

Al fine di ridurre il rischio più importante dei tumori cutanei e cioè le scottature in età infantile, i messaggi devono essere rivolti ai genitori, medici scolastici, insegnanti delle scuole elementari, operatori dell'area sportiva. Deve essere coinvolto in particolare il medico di medicina generale che, conoscendo i propri assistiti, è in grado di selezionare i soggetti a rischio a cui indirizzare i messaggi per una corretta prevenzione primaria. I migliori risultati si ottengono con programmi televisivi eventualmente supportati da testimonial che danno messaggi chiari e comprensibili: l'abbronzatura è il risultato di

un danno, nei soggetti a pelle chiara il sole invecchia precocemente la pelle e induce un aumento di tutti i tipi di tumori della pelle. Possono anche essere utilizzati libretti da distribuire, per esempio, nelle agenzie che organizzano viaggi per vacanze al sole, aeroporti ecc. Sono anche efficaci articoli su giornali, riviste, conferenze ecc. L'utilizzo di appositi questionari consente la valutazione delle modificazioni nelle abitudini della popolazione verso l'esposizione al sole (23).

## **PREVENZIONE SECONDARIA: SCREENING E CAMPAGNE PER LA DIAGNOSI PRECOCE DEL MELANOMA**

Per ridurre la mortalità da tumore fondamentali sono le attività di prevenzione primaria con il fine di ridurre l'incidenza della neoplasia e le campagne di prevenzione secondaria con lo scopo di ridurre la mortalità. Nel melanoma il controllo dei risultati delle attività di prevenzione primaria è difficile: essi infatti sono documentabili solo a distanza di almeno 10-15 anni e nelle nostre popolazioni le campagne di educazione rivolte alla fotoprotezione sono state intraprese solo negli ultimi anni (l'esposizione alla luce solare è ritenuta il fattore esogeno più importante anche se non l'unico nella genesi del melanoma) (24, 25).

Il documentato miglioramento della prognosi, la continua riduzione dell'incremento della mortalità da melanoma sono fenomeni da riferire solo all'attività di prevenzione secondaria. In effetti è stato possibile dimostrare i risultati favorevoli di tali attività valutando (quasi in tempo reale) le variazioni in percentuale dei casi di melanoma a prognosi sfavorevole misurando lo spessore delle neoplasie, a tutt'oggi il parametro prognostico più accurato (26-29).

Anche la riduzione della mortalità può essere evidenziata in un lasso di tempo limitato (4-5 anni). Lo screening di massa rappresenta il migliore presidio di prevenzione secondaria dei tumori. Lo screening di massa del melanoma non è attualmente proponibile per gli alti costi riferibili alla necessità da parte di specialisti dermatologi "esperti" di esaminare l'intero ambito cutaneo di tutti i soggetti al di sopra dei 16-18 anni (30, 31). Più proponibile è uno screening selettivo diretto ai soggetti a rischio con: familiarità per melanoma, cute pallida che non si abbronzia e si scotta al sole (cute tipo 1-2 di Fitzpatrick), alto numero di nevi comuni o presenza di più nevi atipici, e in particolare ai portatori di lesioni pigmentate che si modificano o presentano aspetti di asimmetria, bordi dentati, colorito molto scuro o policromia, dimensioni superiori a 6 mm (A, B, C, D, E del melanoma) (Tabella 3) (31, 32).

È evidente che lo screening selettivo deve essere preceduto da una opportuna campagna sanitaria indirizzata a sensibilizzare la popolazione sugli aspetti sopra descritti che portino a sospettare le lesioni pigmentarie potenzialmente pericolose (Tabella 4) (30).

Inoltre, vanno sensibilizzati gli operatori sanitari (medici di famiglia, specialisti dermatologi, infermieri ecc.) facendo comprendere

l'importanza della loro collaborazione e fornendo nozioni tecniche utili a migliorare le loro capacità diagnostiche.

**Tabella 3. A B C D E del melanoma**

A)	come	ASIMMETRIA	della	lesione
B)	come	BORDI IRREGOLARI,	a	"carta geografica"
C)	come	COLORE: marrone scuro,	nero	o policromo
D)	come	DIMENSIONE: diametro superiore	ai	6 mm.
E)	come	EVOLUZIONE in:		
	-	dimensione (raddoppia	in	3-6 mesi)
	-	forma (diventa più	chiaro	o più scuro)
	-	superficie (si eleva, assume aspetto rugoso con aumento della quadrettatura cutanea).		
E)	come	ETÀ postpubere		

**Tabella 4. Siete un soggetto a rischio per melanoma?**

<input type="radio"/>	- La vostra pelle abbronzata facilmente e tollera bene il sole?
<input type="radio"/>	- Non avete nei?
<input type="radio"/>	- Avete qualche neo regolare e che è rimasto inalterato?
<input type="radio"/>	- Avete sofferto in gioventù di scottature solari?
<input type="radio"/>	- Avete più di 40 nei? avete molte lentiggini?
<input type="radio"/>	- Avete uno o più nei irregolari di diametro superiore a 1 cm?
<input type="radio"/>	- Avete parenti che hanno sofferto di melanoma?
<input type="radio"/>	- Avete 1 o più nei irregolari per bordi colore e dimensioni?
<input type="radio"/>	- Maggiori di 6 mm e/o che si modificano?
<input type="radio"/>	- Avete un neo insorto in età adulta e che si modifica?

nessun rischio particolare  
 o basso rischio: controllo dal dermatologo 1 volta all'anno  
 o o altoo rischio, rivolgersi presto al dermatologo

Per una buona riuscita di una campagna di educazione sanitaria e screening del melanoma vanno tassativamente rispettate alcune fasi organizzative (33).

**I fase Definizione del territorio:**

la campagna dovrà essere condotta esclusivamente all'interno di un territorio ben definito dove vi sia certezza che le strutture sanitarie pubbliche siano in grado di dare un'adeguata risposta alla richiesta di prestazioni che la campagna produce. Si considera ottimale un'area provinciale.

**II fase Formazione di un gruppo polidisciplinare di riferimento:**

tale gruppo dovrà comprendere possibilmente i seguenti specialisti: dermatologo, chirurgo plastico, chirurgo oncologo o generale,

oncologo medico, oculista, patologo e dovrà operare collegialmente. E' consigliabile istituire un ambulatorio diagnostico gestito da un dermatologo affiancato da un ambulatorio di follow up gestito dal gruppo polidisciplinare. E' consigliabile designare un coordinatore responsabile e utilizzare una cartella clinica comune computerizzata.

### **III fase Ricerca del consenso, dei finanziamenti e produzione del materiale.**

A) ricerca del consenso: le istituzioni da contattare sono l'ordine dei medici e dei farmacisti, l'assessorato alla sanità, le ASL, le aziende ospedaliere, le organizzazioni sindacali dei medici, le organizzazioni di categoria, ecc.

B) ricerca dei finanziamenti: dovranno essere contattati la Regione, la Provincia, le ASL, le banche locali, le organizzazioni di volontariato (lega tumori, associazione nazionale ricerca cancro, eventuali privati).

C) produzione del materiale didattico e informativo: deve essere approntato il seguente materiale:

- slogan della campagna e messaggio grafico;
- pieghevole per il pubblico che dovrà contenere la lotta ai pregiudizi e utilizzare messaggi soft escludendo le immagini cliniche in grado di provocare panico (Tabella 5);
- libretto informativo con messaggio didattico per i medici capaci di fornire chiare indicazioni utilizzando anche la formula dell'ABCDE del melanoma (Tabella 6)
- spot per radio e tv locali.

### **IV fase Formazione del gruppo specialistico sul territorio.**

Dovranno essere identificati gli specialisti disposti a collaborare, possibilmente dislocati in modo uniforme sul territorio. Dovranno essere in stretto contatto con il Centro polidisciplinare di riferimento e operare con i seguenti strumenti: cartella clinica comune computerizzabile (sito Internet: <http://serverest.itc.it/~forti/GIP-ME/>), prestampati per la risposta al medico di famiglia con notizie diagnostiche, sulle procedure terapeutiche e sulle eventuali necessità di successivi controlli clinici.

### **V fase**

**A) Coinvolgimento del medico di famiglia** anche con l'appoggio dell'ordine dei medici. Tale coinvolgimento è di estrema importanza per indirizzare i pazienti realmente a rischio di melanoma, evitandone l'afflusso indiscriminato agli ambulatori specialistici e dare continuità alla campagna anche a distanza dalla trasmissione dei messaggi con i media.

**B) Coinvolgimento informativo di altri operatori sanitari** in particolare i farmacisti e gli infermieri professionali.

**C) Coinvolgimento informativo di operatori dell'area estetica** e del mondo sportivo finalizzato a far capire la pericolosità di alcune lesioni pigmentarie da far controllare dal medico.

### **VI fase Coinvolgimento della popolazione.**

È la fase finale della campagna e deve essere iniziata solo dopo le precedenti. È fondamentale in quanto la maggior parte dei melanomi viene sospettata dallo stesso soggetto o da un familiare che pertanto devono essere allertati con i seguenti mezzi: invio di apposito pieghevole al capo famiglia, locandine nelle farmacie, ambulatori

pubblici, negozi ecc., spot sulle tv e radio locali, pubblicità murale, pubblicità sui tram, pubblicità ed appositi servizi sui giornali locali.

Sono stati prospettati due tipi di campagne: una di durata annuale da attuare come primo intervento nelle zone non sensibilizzate; l'altra caratterizzata da breve durata (una settimana) di intensa campagna sui quotidiani locali.

**Tabella 5. Manifesto e pieghevole della campagna che si propone di sensibilizzare la popolazione al problema del melanoma cutaneo**

**C'ERA UNA VOLTA UN NEO CHE  
CRESCOVA ..... CRESCOVA.....  
E NESSUNO GLI BADAVA**

**SE UN NEO CRESCE NON RESTARE A  
GUARDARE:  
PARLANE CON IL TUO MEDICO**

**Tabella 6. Copertina del libretto informativo per il medico di famiglia**

**IL MELANOMA  
LANCIA  
SEGNALI D'ALLARME.**

**TU,  
PER SALVARE UNA VITA,  
DEVI SOLTANTO  
VEDERLI**

#### ***Valutazione dei risultati***

La prova certa dell'efficacia dello screening può derivare solo da studi clinici controllati e randomizzati ma siccome è difficile individuare un gruppo di controllo in quanto tutta la popolazione in generale è sensibilizzata al problema, studi del genere non sono mai stati portati a termine. Mancano anche, per ora, stime di efficacia da studi caso-controllo. La letteratura documenta però che la prognosi dei soggetti che si sono presentati al medico perché sensibilizzati dalle campagne di educazione sanitaria è nettamente migliore rispetto ai casi che si erano presentati al di fuori delle campagne stesse. Inoltre le campagne hanno nettamente aumentato il numero di melanomi diagnosticati in fase precoce con spessore sottile e prognosi favorevole (34). Recentemente, nelle comunità dove sono state organizzate campagne per la diagnosi precoce, è stata documentata una riduzione della mortalità da melanoma, molto evidente se confrontata con comunità in cui le campagne non erano state realizzate. E' stato anche possibile definire il numero delle vite salvate e calcolare il rapporto costo-beneficio che è risultato molto favorevole (35-37).

L'effetto negativo delle campagne che influisce pesantemente sui costi è l'eccessivo afflusso di soggetti sani (falsi positivi) sensibilizzati

e il numero di interventi bioptici che si sarebbero potuti evitare. Questo inconveniente potrà essere ridotto con il maggiore coinvolgimento dei medici di base, che potranno filtrare la domanda e migliorando le capacità diagnostiche dei dermatologi, anche con l'aiuto di moderne tecnologie (microscopia a epiluminescenza e analisi computerizzata).

## 1.1 APPENDICE

### Decalogo della fotoprotezione

*"Mi piace stare all'aria aperta ma mi proteggo dal sole"*

1. Evita le esposizioni eccessive e le scottature da sole soprattutto nei bambini ed in presenza di cute pallida che si abbronzia con difficoltà e si scotta facilmente.
2. I bambini fino al 6° mese non devono essere esposti al sole.
3. Evita le esposizioni al sole nei climi caldi attorno al mezzogiorno (ore 11-14).
4. Utilizza indumenti, cappello con visiera, camicie, magliette, occhiali.
5. Utilizza l'ombra naturale (alberi) e crea protezioni come ombrelloni, ecc..
6. Ricorda che la migliore fotoprotezione è l'ombra e che un indumento appropriato protegge più di qualunque crema solare.
7. Usa, specie se la tua pelle è pallida, creme solari ad alta protezione che contengano filtri che bloccano non solo gli UVB, responsabili delle scottature, ma anche gli UVA.
8. Le creme antisolari devono essere applicate in dosi adeguate più volte al giorno ed essere resistenti all'acqua.
9. Alcune sedi sono da proteggere in modo particolare: naso, orecchie, petto, spalle, dorso piedi, cuoio capelluto (se calvi).
10. Evita l'abbronzatura "artificiale" (lettini UVA) che oltretutto invecchia precocemente la pelle.

### Il sole e la pelle

*Luoghi comuni: miti (M) e realtà (R)*

- M.** I bambini per crescere bene necessitano di una forte esposizione solare.
- R.** Per la salute del bambino ed evitare il rachitismo (la luce solare stimola la produzione di vitamina D) sono sufficienti piccole quantità di raggi UV.  
Al contrario le esposizioni solari eccessive in giovane età, sono correlate con l'aumento del rischio di tumori cutanei.
- M.** Il bimbo (l'uomo) abbronzato è più sano.
- R.** L'abbronzatura è il segno di un danno non solo transitorio
- M.** Negli ultimi anni il sole è cambiato
- R.** Non è vero: è cambiato invece il nostro comportamento, aumentando il numero e l'intensità delle esposizioni al sole.
- M.** I danni dell'esposizione solare sono solo temporanei e si riparano

spontaneamente.

- R.** Anche se le scottature superficiali sono facilmente guaribili il danno profondo rimane e nel tempo (dopo 20-30 anni) diviene evidente (fotoinvecchiamento, tumori, etc).
  
- M.** Il tumore della pelle si sviluppa come processo naturale dell'invecchiamento indipendentemente dagli stili di vita.
- R.** È vero che il tumore cutaneo è più presente nell'anziano, ma è documentato il ruolo causale delle eccessive esposizioni solari specie in giovane età.  
Ricerche epidemiologiche dimostrano che le modificazioni nel nostro comportamento verso il sole hanno determinato l'insorgenza dei tumori cutanei (e del melanoma) in soggetti sempre più giovani.
  
- M.** Le creme solari sono la migliore protezione contro il sole.
- R.** Gli attuali filtri solari hanno efficacia nettamente inferiore a quelle delle precauzioni tradizionali (evitare il sole nelle ore centrali della giornata, indossare cappelli ed indumenti).

## BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

1. Parkin D.M., Pisani P., Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int. J. Cancer*, 80: 827-841, 1999.
2. Armstrong B.K., English D.R. Cutaneous malignant melanoma. In "Cancer Epidemiology and Prevention", D. Schottenfeld, J.F. Fraumeni Jr. (Eds.), Second Edition, Oxford University Press, New York, 1282- 1312, 1996.
3. ISTAT, Sistema Statistico Nazionale Istituto di Statistica. Classificazioni delle malattie, traumatismi e cause di morte. Metodi e norme serie C no. 10. 9a Revisione. ISTAT, Roma (1975).
4. Bidoli E., Franceschi S., Redivo A., et al. Atlante della mortalità per tumori nelle Regioni e Province del Nord-Est e in Italia, 1990-94. Centro di Riferimento Oncologico, Aviano, Italia, 1999.
5. Franceschi S., Bidoli E., Prati S., Fascioli S., La Vecchia C. Mortality from skin melanoma in Italy and Friuli-Venezia Giulia region, 1970-89. *Tumori*, 80: 251-256, 1994
6. Balzi D., Bidoli E., Franceschi S., et al. Stima dell'Incidenza e Mortalità per Tumore nelle Regioni Italiane, 1990. Centro di Riferimento Oncologico, Aviano, Italia, 1997.
7. Zanetti R., Crosignani P., Ross S. Il cancro in Italia. I dati di incidenza dei Registri Tumori, 1988-1992. Volume secondo. Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori. Associazione Italiana di Registri Tumori. Pensiero Scientifico Editore, Torino (1997).
8. Ferlay J., Black R.J., Pisani P., Valdivieso M.T., Parkin DM. EUCAN90: Cancer in the European Union. Electronic Database with Graphic Display. IARC CancerBase No. 1. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1996.
9. La Vecchia C., Lucchini F., Negri E., Levi F. Recent declines in worldwide mortality from cutaneous melanoma in youth and middle age. *Int. J. Cancer*, 81: 62-66, 1999.
10. Smith J.A.E., Whatley P.M., Redburn J.C., and the EURO CARE Working Group. Improving survival of melanoma patients in Europe since 1978. *Eur. J. Cancer*, 34: 2197-2203, 1998
11. Micheli A. (Ed.) Cancer prevalence in Italy. The ITAPREVAL study. *Tumori*, 85, 1999.
12. Bliss J.M., Ford D., Swerdlow A.J., et al. Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. *Int. J. Cancer*, 62: 367-376, 1995.
13. Tucker M.A., Halpern A., Holly E.A., et al. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA*, 277: 1439-1444, 1997.
14. IARC. Solar and ultraviolet radiation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 55. IARC, Lyon, 73-95, 217-28, 1992.
15. Elwood J.M., Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int. J. Cancer*, 73: 198-203, 1997.
16. Gilchrest B.A., Eller M.S., Geller A.C., Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *New Engl. J. Med.*, 340: 1341-1348, 1999.

17. Turner M. Sun safety: avoiding noonday sun, wearing protective clothing, and the use of sunscreen. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90: 1854-1855, 1998.
18. Autier P., Doré J.F., Cattaruzza M.S., et al. Sunscreen use, wearing clothes, and number of nevi in 6- to 7-year-old european children. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90: 1873-1880, 1998.
19. IARC. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Solar and Ultraviolet Radiation. 55: 95-122, 1992.
20. Elwood J.M. Melanoma and sun exposure: contrasts between intermittent and chronic exposure. *World J. Surg.*, 16: 157-165, 1992.
21. Kelly J.W., Rivers J.K., MacLennan R., et al. Sunlight: a major factor associated with the development of melanocytic nevi in children. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 30: 40-48, 1994.
22. Rivers J.K., MacLennan R., Kelly J.W., et al. The eastern Australian childhood nevus study: prevalence of atypical nevi, congenital nevus-like nevi and other pigmented lesions. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 32: 957-963, 1995.
23. Theobal T., Marks R., Hill D., et al. Goodbye sunshine: effects of a television program about melanoma on beliefs, behavior, and melanoma thickness. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 25: 717-723, 1991.
24. Redman J.C. Preventing deaths from malignant melanomas. *Am. J. Dermatopathol.*, 6: 109-111, 1994.
25. Arundell F.D. Campaigns for the detection and prevention of melanoma and skin cancers. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 16: 406-407, 1987.
26. Illig K. Paul E., Hunddeiker M., et al. Public and professional melanoma educations. *Z. Hautker.*, 58: 73-112, 1983.
27. Cristofolini M., Zumiani G., Boi S., et al. Community detection of early melanoma. *Lancet*, 1: 156, 1986.
28. Doherty V.R., Mackie R.M. Experience of a public education programme on early detection of cutaneous malignant melanoma. *Br. Med. J.*, 297: 388-391, 1988.
29. Koh H.K., Caruso A., Gage I., et al. Evaluation of melanoma. Skin cancer screening in Massachussetts. Preliminary results. *Cancer*, 65: 375-379, 1990.
30. Koh H.K., Miller D.R., Geller A.C., et al. Who discovers melanoma? *J. Am. Acad. Dermatol.*, 26: 914-919, 1992.
31. Friedman R.J., Riegel D.S. Kopf A. W. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *Cancer*, 35: 130-151, 1985.
32. Mackie R.M., Freudenberger T., Aitchison T.C. Personal risk-factor chart for cutaneous melanoma. *Lancet*, 2: 487-490, 1989.
33. Cainelli T., Cristofolini M. Campagne di educazione sanitaria per la diagnosi precoce del melanoma. Ed. Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori, 1994.
34. Cainelli T., et al. Campagne di educazione sanitarie per la diagnosi precoce del melanoma nella provincia di Bergamo. *G. Ital. Dermatol. Venerol.*, 131: 367-371, 1996.

35. Cristofolini M., Bianchi R., Boi S., et al. Effectiveness of the Health Campaign for the early diagnosis of cutaneous melanoma in Trentino, Italy. *J. Dermatol. Surg. Oncol.*, 19: 117-120, 1993.
36. Cristofolini M., Bianchi R., Boi S., et al. Analysis of the cost-effectiveness ratio of the Health Campaign for the early diagnosis of cutaneous melanoma in Trentino, Italy. *Cancer*, 71: 370-374, 1993.
37. Garattini L., Cainelli T., Tribbia G., Scopelliti D. Economic evaluation of an educational campaign for early diagnosis of cutaneous melanoma. *Pharmacoeconomics*, 146-155, 1996.

## 2. BIOLOGIA

### 2.1 GENETICA

#### IL MELANOMA FAMILIARE

Circa il 10% dei pazienti con melanoma citano almeno un altro membro della propria famiglia come affetto da melanoma (1). La natura familiare del melanoma non oculare è stata osservata per primo da Cawley nel 1952 (2). La presenza di forme ereditarie di melanoma ha suggerito una base genetica e il primo modello ereditario, realizzato tramite analisi di segregazione, ha consentito di formulare un meccanismo autosomico dominante con penetranza variabile (1). Nel 1978, Clark (3) descrisse, in famiglie con melanoma, un precursore ("B-K mole"), successivamente rinominato "nevo displastico". Anche l'inserimento della sindrome del nevo displastico (DNS) nell'analisi genetica delle famiglie evidenziò un meccanismo autosomico dominante come base dell'eziologia del melanoma familiare. Questi studi suggerirono anche che DNS e melanoma, in tali famiglie, rappresentavano effetti pleiotropici di un singolo gene (4-5). La relazione tra DNS e melanoma familiare non è tuttavia del tutto chiarita per le seguenti cause: a) presenza di melanoma familiare in famiglie prive di DNS; b) presenza di nevi displastici in forma sporadica in proporzioni variabili (tra il 5 e il 53% dei casi a seconda degli studi) in individui non appartenenti a famiglie con predisposizione ereditaria al melanoma (1) (vedi anche paragrafo: eterogeneità genetica del melanoma familiare).

#### ***Alterazioni di geni oncosoppressori nel melanoma familiare***

Cannon-Albright, Skolnik e collaboratori (6) all'inizio degli anni '90, con studi di linkage, identificarono la regione cromosomica 9p13-p22 come sede di un locus, situato tra i marcatori D9S126 e IFN- $\alpha$  che controlla la predisposizione al melanoma familiare e probabilmente contenente un gene oncosoppressore. L'identificazione del gene oncosoppressore in 9p è avvenuta grazie allo sviluppo della strategia di analisi genetica nota come "positional cloning" modificata per la ricerca di delezioni omozigoti in cellule neoplastiche. Questa complessa procedura ha permesso di isolare un frammento di DNA (tecnicamente si trattava di un cosmide) che conteneva due sequenze correlate definite MTS1 e MTS2 (7). Una di queste conteneva gli esoni di un gene precedentemente identificato. Il gene (a cui sono stati attribuiti vari nomi, incluso p16, MTS1, INK4A, CDKN2, CDKN2A) contribuisce a codificare due distinte proteine p16 e p19ARF. In realtà, sebbene i geni per p16 e p19ARF mappino nella stessa zona cromosomica, le proteine p19ARF e p16 hanno in comune solo l'esone 2.

#### ***La funzione del gene p16***

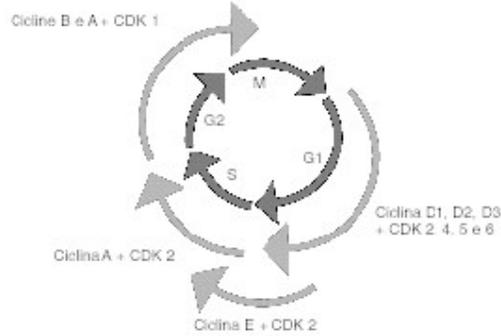
La proteina p16 è stata scoperta nel 1993 (8-9) in cellule trasformate, come un complesso che comprendeva PCNA (proliferating cell nuclear antigen), ciclina D e la chinasi ciclina-dipendente CDK4. Successivamente si è chiarito che p16 è una

subunità regolatrice negativa di CDK4 e di CDK6. CDK4 e CDK6 controllano la progressione attraverso la fase G1 del ciclo cellulare (10) (Figura 1). Le cicline D sono co-fattori delle chinasi CDK4 e 6, e la funzione di CDK4 e CDK6 è quella di fosforilare la proteina del gene del retinoblastoma (Rb). Una delle funzioni della proteina codificata da RB è quella di formare complessi con fattori di trascrizione che risultano in tal modo inibiti funzionalmente. La fosforilazione di Rb determina il distacco dei fattori di trascrizione ad esso legati. I fattori di trascrizione rilasciati a loro volta consentono l'espressione di geni necessari alla progressione attraverso G1. La funzione di p16 come inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti lo configura come un gene oncosoppressore in quanto in sua mancanza viene meno un controllo negativo sulla proliferazione cellulare. Delezioni di p16 sono state trovate in un'alta percentuale di molti tumori umani di diversa origine istologica, incluso il melanoma, indicando un possibile ruolo generale di alterazioni di p16 nella trasformazione neoplastica di diversi tessuti (11).

### ***Ruolo di p16 nel melanoma familiare***

Nel 1994 Hussussian e collaboratori (12), in un gruppo di famiglie con melanoma con linkage a marcatori della regione cromosomica 9p21, identificarono, tramite analisi SSCP ("single strand conformational polymorphism"), sei diverse mutazioni di p16 nella linea germinale in 9 su 15 famiglie. Le mutazioni erano del tipo "missense", "nonsense", "frameshift" ed anche mutazioni dei siti di "splicing". Tali mutazioni vennero trovate solo in famiglie con melanoma in linkage con marcatori della regione cromosomica 9p21 e non in famiglie con melanoma in linkage con marcatori alla regione 1p36 (vedi paragrafo successivo). In 33/36 casi di melanoma delle famiglie "9p21", il gene p16 risultava alterato fornendo una forte evidenza di associazione con lo sviluppo della neoplasia. Per contro solo 10 su 33 casi di DNS presentavano mutazioni di p16, a conferma dei dubbi circa il meccanismo unico e comune di ereditarietà di DNS e melanoma (12). In molti casi le proteine mutate di p16 sono state saggiate funzionalmente ed hanno rivelato difetti di legame a CDK (in-vitro) e di difetti di inibizione della proliferazione (in-vivo). Studi successivi (condotti su famiglie negli Stati Uniti, Inghilterra, Francia, Israele, Svezia, Australia, Austria, Italia etc..) hanno indicato l'esistenza di un ampio spettro di mutazioni a carico di diverse zone codificanti del gene p16. Tali mutazioni potevano essere distinte sia per la localizzazione (in termini di esoni e codoni coinvolti) sia per il tipo di sostituzione di base, sia per le conseguenze funzionali sull'espressione e funzione genica. Più recentemente, l'analisi per la presenza di mutazioni a carico di p16 nella linea germinale è stata estesa a pazienti che presentavano melanomi primitivi multipli, ma che appartenevano a famiglie prive di predisposizione ereditaria alla malattia (cioè famiglie senza altri membri affetti). L'insorgenza di melanomi primitivi multipli ha suggerito una suscettibilità genetica che è stata confermata in questi pazienti ed in altri membri delle loro famiglie dalla presenza di mutazioni di p16 nella linea germinale (13).

Figura 1. Ruolo di chinasi ciclina-dipendenti nella regolazione del ciclo cellulare.



Il ciclo cellulare è diviso in quattro fasi (Fig. 1). Dopo la divisione cellulare si ha una fase (G1) seguita da sintesi di DNA (S), da una seconda fase (G2) e da una successiva mitosi (M). Tutte le fasi del ciclo, e le transizioni da una fase alla successiva sono regolate dall'azione di enzimi (chinasi) costituite da una subunità regolatrice e da una subunità catalitica. Le cicline sono subunità regolatorie che si legano a subunità catalitiche (CDK) per formare complessi ciclina-CDK enzimaticamente attivi. Le cicline durante il ciclo subiscono fasi di sintesi e degradazione, predisponendo un meccanismo di regolazione delle CDK. L'attività delle CDK è inoltre regolata da piccole proteine (tra cui p15, p16, p21, p27) chiamate inibitori di CDK. Questi piccoli inibitori si legano ai complessi ciclina-CDK. I complessi attivi ciclina-CDK guidano la cellula attraverso momenti particolari del ciclo cellulare, chiamati "checkpoints" che consentono alla cellula di procedere da una fase all'altra del ciclo. L'attività enzimatica dei complessi ciclina-CDK consente di fosforilare gruppi di proteine che sono essenziali per la transizione da una fase all'altra del ciclo.

### ***Eterogeneità genetica nel melanoma familiare***

Studi di vari gruppi, successivi al lavoro di Hussussian (discussi anche in ref. 14), hanno indicato che mutazioni di p16 si ritrovano in proporzioni variabili di famiglie con membri affetti da melanoma. Infatti dal 20% fino a >60% delle famiglie studiate presenta mutazioni di p16 che co-segregano con il melanoma. La proporzione di famiglie con mutazioni nella linea germinale a carico di p16, tra le famiglie con melanoma ereditario, varia molto nei diversi studi a seconda del numero di individui affetti e del background etnico. Di conseguenza anche il melanoma familiare è eterogeneo nelle sue cause genetiche. Ad esempio, ci sono famiglie con forte evidenza di linkage a marcatori localizzati nella regione 9p21 ma che mancano di mutazioni a carico di p16 (14). Ciò ha suggerito la presenza di un secondo gene oncosoppressore, diverso da p16, nella stessa regione cromosomica 9p21. Sebbene la zona contenga il gene MTS2 (o p15), che come p16 funziona da inibitore di CDK, nessuna mutazione germinale di p15 è stata trovata. È anche possibile che alcuni geni p16 apparentemente normali abbiano in realtà mutazioni non in zone codificanti (esoni), ma in zone regolatrici (a monte del promotore) ancora non esplorate. Dati recenti (15) indicano che questa possibilità è reale. Infatti in alcune famiglie che dimostrano linkage del melanoma ereditario a marcatori della regione cromosomica 9p21,

ma che non presentano mutazioni nella regione codificante di p16, è stata trovata una mutazione a monte del promotore del gene. Tale mutazione crea un nuovo codone di inizio (AUG) e determina una riduzione della trascrizione genica dal promotore normale del gene. Ulteriori dati indicano che in alcune famiglie il meccanismo di suscettibilità genetica al melanoma è basato non sulla delezione, ma sull'attivazione nella linea germinale di un gene diverso da p16. Anche questo gene contribuisce, come p16, a regolare il ciclo cellulare. Infatti, in alcune famiglie sono state trovate mutazioni nella linea germinale a carico del gene CDK4 (16). La mutazione a carico di CDK4 altera la sequenza della proteina a livello del sito di interazione con p16. In entrambi i casi (mutazioni a carico di CDK4 o di p16) la capacità di chinasi come CDK4 di fosforilare Rb viene scissa da un controllo negativo. Ciò può predisporre un meccanismo che favorisce la continua proliferazione cellulare. Inoltre, mentre p16 si comporta come gene oncosoppressore, CDK4 funziona come oncogene (16). CDK4 da questo punto di vista è il terzo oncogene implicato nella predisposizione ereditaria al cancro (gli altri sono RET e MET). Le mutazioni di CDK4 quindi funzionano in modo dominante, mentre le alterazioni di p16 hanno un meccanismo recessivo, in quanto, in quest'ultimo caso, per svelare l'effetto sulla trasformazione neoplastica è necessaria la presenza di una lesione genetica a carico del primo allele nella linea germinale e la successiva delezione o inattivazione dell'allele normale nella linea somatica.

Ulteriore eterogeneità genetica alla base del melanoma familiare deriva dall'evidenza, in parte discussa, per un locus per il melanoma ereditario mappato con studi di linkage nella regione cromosomica 1p36 (17). Nello studio di Bale (17) il gruppo di famiglie era caratterizzato da melanoma familiare e da DNS, fatto che ha suggerito un meccanismo comune per l'eredità di DNS e melanoma in tali casi. Questo dato è in contrasto con le famiglie che mostrano un linkage con 9p21, nelle quali DNS è stato trovato solo in 10/33 casi che presentavano mutazione di p16 (12). Questi dati confermano non solo l'eterogeneità genetica del melanoma familiare, ma anche la relazione complessa tra DNS e melanoma.

## **2.2 IMMUNOLOGIA**

### **LINFOCITI T TUMORE-SPECIFICI INFILTRANO IL TUMORE PRIMITIVO E/O LE LESIONI METASTATICHE**

Il modello di progressione tumorale per il melanoma primitivo in stadio I e in fase di crescita verticale (VGP), proposto da W. Clark nel 1989 (18), attribuiva un valore di fattore prognostico indipendente alla presenza di linfociti infiltranti la neoplasia (TIL, "tumor infiltrating lymphocytes"). Questo dato suggeriva un possibile coinvolgimento del sistema immunitario nel controllo della progressione tumorale.

Gli studi iniziati da Clark e Elder e proseguiti da Clemente, Mihm e Cascinelli (19) hanno dimostrato che la lesione primitiva può presentare, in relazione all'infiltrato, tre situazioni diverse, definite come "brisk", "non-brisk" o "absent". I risultati nel melanoma primitivo con componente di crescita verticale (quindi un melanoma che ha acquisito la competenza per la metastasi) avevano indicato che questa classificazione ha un valore prognostico in quanto la sopravvivenza a 5 e 10 anni era nettamente migliore nel sottogruppo di pazienti con infiltrato di tipo brisk rispetto ai pazienti con infiltrato di tipo non-brisk e la differenza era ancora più marcata nel paragone tra sottogruppo brisk e sottogruppo absent (18). Quest'analisi è stata recentemente ripetuta su metastasi linfonodali (19). Nel caso di metastasi linfonodali di melanoma la crescita del tumore è stata paragonata alla fase di crescita verticale della neoplasia primitiva e all'interno della massa proliferante si è studiata la presenza di TIL. I risultati hanno dimostrato che i tre gruppi di pazienti con infiltrato classificato come brisk, non-brisk o absent hanno sopravvivenze (valutate a 30 mesi) distinte con un netto vantaggio a favore del gruppo con infiltrato di tipo brisk. Questi risultati suggeriscono che anche a livello di lesioni metastatiche, la presenza di un infiltrato linfocitario (e quindi, indirettamente, la presenza di una risposta immunitaria) possa costituire un parametro importante per predire l'evoluzione della malattia.

## **RICONOSCIMENTO DEL MELANOMA DA PARTE DI LINFOCITI T ISOLATI DAL SANGUE PERIFERICO O DALLA LESIONE NEOPLASTICA**

In accordo con i dati derivanti dallo studio dell'infiltrato linfocitario, studi condotti a partire dall'inizio degli anni '80 avevano indicato che linfociti T isolati dal sangue periferico (PBL, "peripheral blood lymphocytes") o dal tessuto neoplastico (TIL) di pazienti con melanoma primitivo o metastatico potevano, dopo attivazione in-vitro, riconoscere in modo specifico il tumore autologo e determinarne la lisi cellulo-mediata (20). La procedura sperimentale (MLTC, mixed lymphocyte-tumor culture) consisteva nella co-cultura a lungo termine di linfociti T e cellule neoplastiche irradiate in presenza di interleuchina-2, come fattore di crescita per i linfociti T. Queste osservazioni iniziali implicavano l'esistenza di antigeni tumorali sul melanoma umano e il loro riconoscimento da parte del sistema immunitario del paziente.

Ulteriori studi condotti con tecniche molecolari hanno permesso di verificare che, in una frazione dei pazienti, i linfociti T tumore-specifici che infiltrano o il tumore primitivo o le lesioni metastatiche costituiscono in realtà espansioni clonali di pochi o anche di un solo clone T (21). Ciò ha indicato che la lesione neoplastica può essere sede di proliferazione di cloni di linfociti T antigenespecifici. Tale proliferazione è apparentemente guidata dall'espressione di antigeni tumorali sulle cellule neoplastiche.

## **IL MELANOMA UMANO ESPRIME ANTIGENI TUMORALI RICONOSCIUTI DA LINFOCITI T AUTOLOGHI**

A partire dall'inizio degli anni '90, ad opera degli studi pionieristici di T. Boon, è stato possibile identificare una serie di geni espressi nel melanoma umano e che codificano per antigeni tumorali riconosciuti da linfociti T sia a fenotipo CD8 che CD4 (22). Gli antigeni tumorali sono peptidi derivati dalla degradazione intra-cellulare di proteine. Tali peptidi si associano, sulla superficie della cellula neoplastica, ad alleli del maggior complesso di istocompatibilità (HLA). Il complesso HLA-peptide viene riconosciuto da un recettore per l'antigene (TCR) espresso in modo clonale da linfociti T. Durante gli anni '90 sono stati identificati molti antigeni tumorali del melanoma umano. Frequentemente l'antigene tumorale deriva dall'espressione in cellule neoplastiche di un gene normale, privo di alterazioni. Tali geni normali possono essere sia tessuto-specifici (cioè con espressione limitata a melanociti normali e a cellule di melanoma) o essere espressi prevalentemente in diversi tessuti neoplastici ma non nella controparte normale. In tutti questi casi il peptide antigenico viene prodotto con il meccanismo di degradazione intracellulare a partire dalla proteina normale. Il numero di peptidi antigenici già individuati in queste categorie geniche è proporzionale alla dimensione della proteina. È inoltre prevedibile che il numero di peptidi antigenici corrispondenti a proteine di notevole dimensione sia destinato a crescere rispetto alle conoscenze attuali. Antigeni tumorali del melanoma possono essere generati anche con altri meccanismi che si basano su alterazioni strutturali dei geni (es. mutazioni puntiformi). In questi casi il peptide antigenico conterrà la sostituzione aminoacidica, corrispondente alla mutazione, all'interno della propria sequenza. Questo è il caso di antigeni come CDK4, MUM-1 e  $\beta$ -catenina. La generazione di antigeni tumorali del melanoma può dipendere anche da altri meccanismi dovuti ad alterata regolazione dell'espressione genica nelle cellule neoplastiche: esempi sono rappresentati da traduzione di mRNA eseguita utilizzando "open reading frames" alternative (come nel caso del gene TRP-1), "splicing" incompleto, traduzione di sequenze introniche (come nel caso del gene TRP-2), trascrizione da un promoter criptico situato all'interno di un introne (Gn-TV), sostituzione post-traduzionale di un aminoacido (uno dei peptidi antigenici di tirosinasi viene prodotto con questo meccanismo). È dunque evidente che all'interno della cellula neoplastica avvengono modificazioni nella regolazione dell'espressione genica capaci di produrre antigeni tumorali con meccanismi distinti dal "semplice" processamento di una sequenza proteica (normale o mutata) risultante dalla traduzione dei soli esoni.

La maggior parte dei peptidi antigenici identificati nel melanoma umano si associano ad alleli HLA di classe I (alleli ai loci HLA-A, -B e -C) e determinano la formazione di epitopi riconosciuti da linfociti T a fenotipo CD8, in genere a funzione citolitica (22). Dati recentissimi indicano comunque che anche linfociti a fenotipo CD4, di tipo helper, possono riconoscere, in associazione a molecole HLA di classe II (es. alleli ai loci HLA-DR, -DP e -DQ), peptidi derivanti dal processamento e degradazione intracellulari di proteine espresse nel melanoma (23). Mentre linfociti CD8+ sono considerati effettori finali della risposta immunitaria, i linfociti CD4+ sono determinanti per l'inizio, l'espansione e il mantenimento della risposta immune. È quindi fondamentale che antigeni tumorali riconosciuti da entrambi i principali subsets di linfociti T vengano identificati e utilizzati come bersagli di approcci di immunizzazione.

Queste scoperte consentono di ipotizzare nuovi sviluppi terapeutici nel settore dell'immunoterapia antigene-specifica che siano applicabili ad una frazione cospicua dei pazienti. Questa possibilità teorica deriva sia dalla molteplicità degli antigeni già individuati, sia dal numero di diversi alleli HLA che sono già stati caratterizzati come elementi di restrizione per antigeni tumorali. Tutti questi approcci terapeutici dipenderanno dalla disponibilità di antigeni tumorali in varia forma. È possibile infatti prevedere l'uso di peptidi sintetici, di geni, di proteine ricombinanti, di lisati di cellule neoplastiche, e di cellule neoplastiche modificate geneticamente per esprimere molecole e fattori immunostimolatori. L'efficacia dei tentativi di potenziare la risposta immunitaria contro antigeni del melanoma non dipenderà solo dalla forma antigenica, ma anche da molti altri fattori. Ad esempio, l'espressione antigenica e di molecole HLA sulle cellule neoplastiche del paziente costituirà un elemento chiave per il riconoscimento immunitario. Inoltre le modalità di somministrazione del vaccino (dosi, vie di inoculo, uso di adiuvanti, impiego di citochine immunoregatorie e di cellule professionali per la presentazione dell'antigene come le cellule dendritiche, etc..) potranno influire in modo determinante sulla capacità effettiva di indurre una risposta immune contro l'antigene oggetto del vaccino.

Studi clinici iniziali di vaccinazione (con peptidi sintetici o con lisati di cellule neoplastiche presentati al sistema immunitario da cellule dendritiche) indicano che è possibile attivare in-vivo, in pazienti con melanoma metastatico, una risposta immune antigene-specifica contro antigeni del melanoma (24-25). A ciò corrisponde anche, in alcuni casi, evidenza di regressione di lesioni neoplastiche preesistenti.

## **IL MELANOMA UMANO PUÒ ELUDERE E/O SOPPRIMERE LA RISPOSTA IMMUNITARIA**

Il primo problema è quello dei meccanismi di elusione della risposta immunitaria da parte del melanoma umano ed è esemplificato dalla nota eterogeneità intra-tumorale per l'espressione sia dei determinanti antigenici sia delle molecole HLA (26). Ciò si realizza sia per assenza di espressione genica in alcune cellule neoplastiche, sia per la comparsa di mutazioni a carico dei geni che codificano per alleli HLA o per proteine coinvolte nel trasporto intra-cellulare dei peptidi (geni TAP). Questi meccanismi possono di fatto abolire l'espressione di antigeni tumorali o dei complessi HLA-peptide antigenico e vanificare la risposta immune T-mediata.

Il melanoma umano può anche attuare una serie di meccanismi immunosoppressivi. Ad esempio cellule neoplastiche possono produrre fattori solubili come TGF- $\beta$ , IL-10, e VEGF (27-29). I meccanismi immunosoppressivi mediati da questi fattori sono distinti: IL-10 può bloccare il differenziamento del subset TH1 (linfociti CD4 "helper", determinanti per lo sviluppo della risposta immune cellulo-mediata). VEGF può inibire la maturazione di cellule dendritiche (cellule deputate alla presentazione di antigeni e all'attivazione dei linfociti anti-tumore). Inoltre, linfociti T isolati da pazienti sono frequentemente caratterizzati da difetti di attivazione, indotti da cellule neoplastiche, e che conducono al blocco della risposta immunitaria (30). Infine, il melanoma umano, soprattutto in fase

metastatica, esprime e rilascia in forma solubile molecole di adesione (come ICAM-1) (31, 32). Queste molecole quando sono in forma ancorata alla membrana giocano un ruolo fondamentale nel consentire il legame tra cellule del sistema immunitario e cellule neoplastiche. Tuttavia, in forma solubile, le stesse molecole di adesione occupano i recettori sui linfociti T e di fatto ne impediscono l'interazione con il tumore.

Le prospettive per uno sviluppo clinico dell'immunoterapia del melanoma dipenderanno in modo determinante dalla capacità di comprendere e contrastare i principali meccanismi di elusione e soppressione della risposta immunitaria ad opera delle cellule neoplastiche.

## **VALUTAZIONE DELLA "ELEGGIBILITÀ BIOLOGICA" A STUDI CLINICI DI TERAPIA IMMUNOLOGICA CON "VACCINI"**

Nel corso degli ultimi anni, lo sviluppo delle conoscenze sulla immunobiologia del melanoma cutaneo, e sul ruolo della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata dell'ospite nell'interazione con le cellule neoplastiche, ha permesso l'applicazione clinica (in presenza di lesioni parametרו o in fase adiuvante) di nuove e più sofisticate applicazioni di terapia immunologica con "vaccini terapeutici" cellulari e/o proteici (33). Tuttavia, la loro applicazione clinica non può prescindere dalla caratterizzazione fenotipica del tumore del singolo paziente, adoperando differenti metodiche di analisi (es. immunoistochimica, citofluorimetria a flusso, analisi degli acidi nucleici), o dalla disponibilità di quantitativi adeguati di tessuto neoplastico per generare "vaccini" autologhi. Pertanto, sono utili alcune considerazioni pratiche sulle metodologie che, in aggiunta alla diagnosi istologica, possono aiutare la pratica clinica permettendo la valutazione della "eleggibilità biologica" di pazienti affetti da melanoma in differente stadio clinico di malattia, al trattamento con "vaccini" diversi.

Al momento, queste considerazioni trovano applicazione prevalentemente nel melanoma metastatico, ma possono essere estese quantomeno al melanoma primitivo ad alto rischio di recidiva, per il quale iniziano ad essere disponibili trattamenti immunologici in fase adiuvante:

1. *Criopreservazione di tessuto neoplastico*: la disponibilità di tessuto neoplastico, congelato a  $-80^{\circ}\text{C}$ , permette l'esecuzione di indagini immunoistochimiche con anticorpi monoclonali (mAb) non reattivi con il tessuto fissato (es. analisi dell'espressione di antigeni che rappresentano il "target" terapeutico, antigeni HLA di classe I ed alleli di "restrizione" per peptidi immunogenici), nonché l'estrazione di acidi nucleici (RNA) per l'analisi dell'espressione di antigeni melanoma-associati mediante RT-PCR. È importante sottolineare che, in molte occasioni, la mancanza di tessuto neoplastico criopreservato non permette di valutare "la eleggibilità biologica", e quindi di candidare a trattamenti di immunoterapia un numero

- rilevante di pazienti affetti da melanoma, riducendo pertanto lo spettro di possibilità terapeutiche potenzialmente applicabili nel singolo soggetto.
- Indicazioni terapeutiche:
- a) immunoterapia con peptidi immunogenici di antigeni tumorali melanoma-associati o di differenziazione melanocitaria (MAGE, MART-1, gp100, ti-rosinasi, etc.);
  - b) immunoterapia passiva con mAb diretti contro antigeni "target" espressi sul tessuto neoplastico;
  - c) immunoterapia attiva specifica con mAb anti-idiotipo;
  - d) preparazione di "vaccini" autologhi (Heat Shock Proteins, cellule APC pulsate con lisato tumorale, etc.).
2. *Criopreservazione di cellule neoplastiche*: ottenute per disgregazione meccanica e/o enzimatica di tessuto tumorale fresco e criopreservate in condizioni vitali. Possono essere adoperate in parziale alternativa al tessuto neoplastico (vedi punto 1), e anche per indagini quantitative dell'espressione di antigeni di membrana e/o intracitoplasmatici (citofluorimetria a flusso, ELISA, etc.).
- Indicazioni terapeutiche:
- a) vedi punto 1;
  - b) creazione di vaccini tumorali autologhi geneticamente modificati.
3. *Estrazione e criopreservazione di acidi nucleici*: permette l'esecuzione di indagini molecolari (es. PCR, RT-PCR, Northern e Southern blotting) per l'analisi dell'espressione nel tessuto neoplastico di antigeni melanomaassociati e di differenziazione melanocitaria.
- Indicazioni terapeutiche:
- a) vedi punto 1 e 2.
4. *Purificazione e criopreservazione di linfociti*: linfociti purificati da sangue periferico e criopreservati in condizioni vitali, possono essere adoperati per definire funzionalmente la presenza di linfociti circolanti antigene-specifici (es. limiting dilution assay, citometria a flusso, enzyme-linked immunospot, tetrameri di complessi HLA-peptide) (34), per la tipizzazione sierologica degli antigeni HLA di classe I del paziente affetto da melanoma, come tessuto non patologico autologo di controllo in test che analizzano il tessuto neoplastico del paziente.
- Indicazioni terapeutiche:
- a) vedi punto 1 e 2.
5. *Criopreservazione del siero autologo*: la disponibilità di siero autologo da sangue periferico permette l'analisi della presenza e la quantizzazione di diversi fattori solubili (es. ICAM-1, S100, differenti citochine) che sembrano rivestire significato prognostico nel melanoma, nonché di anticorpi circolanti diretti contro le cellule neoplastiche.
- Indicazioni terapeutiche:
- a) vedi punto 1 e 2.

## BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

1. Haluska F.G. and Hodi F.S. Molecular genetics of familial cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 16: 670-682, 1998.
2. Cawley E.P. Genetic aspects of malignant melanoma. *Arch. Dermatol. Syphilis* 65:440-450, 1952.
3. Clark W.H. Jr, Reimer R.R., Greene M., et al. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. "The B-K mole syndrome". *Arch. Dermatol.*, 114: 723-728, 1978.
4. Greene M.H., Goldin L.R., Clark W.H. Jr, et al. Familial cutaneous malignant melanoma: autosomal dominant trait possibly linked to the Rh locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 6071-6075, 1983.
5. Bale S.J., Chakravarti A., Greene M.H. Cutaneous malignant melanoma and familial dysplastic nevi: evidence for autosomal dominance and pleiotropy. *Am. J. Hum. Gen.*, 38: 188-196, 1986.
6. Cannon-Albright L.A, Goldgar D.E, Meyer L.J., et al. Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. *Science*, 258: 1148-1151, 1992.
7. Kamb A., Gruis N.A., Weaver-Feldhaus J., et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 264: 436-440, 1994.
8. Xiong Y., Zhang H., Beach D. Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Devel.*, 7: 1572-1583, 1993.
9. Serrano M., Hannon G.J., Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 366: 704707, 1993.
10. Morgan D.O. Principles of CDK regulation. *Nature*, 374: 131-135, 1995.
11. Nobori T., Miura K., Wu D.J., et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*, 368: 753-756, 1994.
12. Hussussian C.J., Struewing J.P., Goldstein A.M., et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature Genet.*, 8: 15, 1994.
13. Monzon J., Liu L., Brill H., et al. CDKN2A mutations in multiple primary melanomas. *N. Engl. J. Med.*, 338: 879-887, 1998.
14. Kamb A. Human melanoma genetics. *J. Invest. Dermatol. Symposium Proceedings*, 1: 177-182, 1996.
15. Liu L., Dilworth D., Gao L., et al. Mutation of the CDKN2A 5' UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma. *Nature Genet.*, 21: 128-132, 1999.
16. Zuo L., Weger J., Yang Q., et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nature Genet.*, 12: 97-99, 1996.
17. Bale S.J., Dracopoli N.C., Tucker M.A., et al. Mapping the gene for hereditary cutaneous malignant melanoma-dysplastic nevus to chromosome 1p. *New Engl. J. Med.*, 320: 1367-1372, 1989.
18. Clark W.H. Jr, Elder D.E., Guerry D. 4th, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J. Natl. Cancer Inst.*, 81: 1893-1904, 1989.

19. Mihm M.C. Jr, Clemente C.G., Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab. Invest.*, 74: 43-47, 1996.
20. Anichini A., Fossati G., Parmiani G., et al. Clonal analysis of cytolytic T cell response to human tumors. *Immunol. Today*, 8: 385-389, 1987.
21. Sensi M. e Parmiani G. Analysis of TCR usage in human tumors: a new tool for assessing tumor-specific immune responses. *Immunol. Today*, 16: 588-595, 1995.
22. Van Pel A., van der Bruggen P., Coulie P.G., et al. Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 145: 229-250, 1995.
23. Chauv P., Vantomme V., Stroobant V., et al. Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 189: 767-778, 1999.
24. Nestle F.O., Aljagic S., Gilliet M., et al. Vaccination of melanoma patients with peptide or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature Med.*, 4: 328-332, 1998.
25. Rosenberg S.A., Yang J.C., Schwartzentruber D.J., et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nature Med.*, 4: 269-270, 1998.
26. Ferrone S., Marincola F.M. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol. Today*, 16: 487-494, 1995.
27. Gabrilovich D.I., Chen H.L., Girgis K.R., et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cell. *Nature Med.*, 2: 1096-1100, 1996.
28. Sato T., McCue P., Masuoka K., et al. Interleukin 10 production by human melanoma. *Clin. Cancer Res.*, 8: 1383-90, 1996.
29. Krasagakis K., Tholke D., Farthmann B., et al. Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)-beta1 and TGF-beta2 in patients with disseminated malignant melanoma. *Br. J. Cancer*, 77: 1492-1494, 1998.
30. Zea A.H., Curti B.D., Longo D.L., et al. Alterations in T cell receptor and signal transduction molecules in melanoma patients. *Clin. Cancer Res.*, 11: 1327-35, 1995.
31. Giavazzi R., Chirivi R.G., Garofalo A., et al. Soluble intercellular adhesion molecule 1 is released by human melanoma cells and is associated with tumor growth in nude mice. *Cancer Res.*, 52: 2628-30, 1992.
32. Natali P.G., Nicotra M.R., Cavaliere R., et al. Differential expression of intercellular adhesion molecule 1 in primary and metastatic melanoma lesions. *Cancer Res.*, 50: 1271-1278, 1990.
33. Maio M., Parmiani G. Melanoma immunotherapy: new dreams or solid hopes? *Immunol. Today*, 17: 405-407, 1996.
34. Romero P., Cerottini J.C., Waanders G.A. Novel methods to monitor antigen-specific cytotoxic T-cell responses in cancer immunotherapy. *Mol. Med. Today*, 4: 305-312, 1998.

## 3. DIAGNOSI DELLA LESIONE PRIMARIA

### DIAGNOSI CLINICA

#### *Modo d'esecuzione della visita*

Una visita finalizzata alla diagnosi del melanoma cutaneo esige, per essere condotta in modo corretto, l'osservazione delle seguenti norme.

6. Il paziente deve essere completamente spogliato e si deve ispezionare tutto l'ambito cutaneo e le mucose visibili; in particolare devono essere controllate quelle sedi che difficilmente il paziente si osserva da solo come il cuoio capelluto, i padiglioni auricolari e la regione retroauricolare, la congiuntiva oculare, la mucosa orale, il solco intergluteo e la regione perianale, i genitali, gli spazi interdigitali e la pianta dei piedi, il letto ungueale.
7. La visita deve essere condotta in un ambiente adeguatamente illuminato, possibilmente in piena luce diurna o con lampade fluorescenti a 3200-3400 Kelvin
8. Nei casi con diagnosi incerta possono trovare utile impiego sistemi ottici di magnificazione dell'immagine (semplice lente d'ingrandimento o sistemi digitali) o la dermatoscopia (vedi "Utilizzo della dermatoscopia nella diagnosi clinica del melanoma").

L'esame clinico delle lesioni cutanee e la palpazione sistematica dei linfonodi deve essere effettuato prima dell'asportazione della lesione primitiva, eseguita a scopo diagnostico o terapeutico. La presenza di linfonodi metastatici o sospetti tali condiziona, infatti, la successiva condotta terapeutica.

#### *Valutazione morfologica della lesione pigmentaria*

Le più comuni lesioni pigmentate della cute sono rappresentate dai nevi melanocitici. Essi possono essere presenti alla nascita (nevi melanociti congeniti) La loro morfologia e la loro dimensione sono in tal caso estremamente variabili: i nevi congeniti piccoli hanno dimensioni inferiori a 1,5 cm e frequenza nell'1-2% dei casi e sono riconoscibili per la presenza nel loro contesto di 1 o più peli terminali. I nevi congeniti medi (dimensioni tra 1,5 e 20 cm e frequenza 0,6%) e giganti (dimensioni oltre i 20 cm fino a ricoprire ampie superfici cutanee e frequenza 0,02%) possono avere forma, colorito e margini molto diversi, talvolta bizzarri. Per la loro maggior probabilità, rispetto agli altri nevi, di evolvere a melanoma sono da molti Autori considerati dei "precursori" e quindi è consigliato il controllo periodico specialistico.

La stragrande maggioranza dei nevi melanocitici (98%) si sviluppa nei primi tre decenni di vita (nevi melanociti acquisiti). I nevi possono essere classificati in 9 fenotipi e 5 varianti (1) ma, al di là di questa classificazione d'utilizzo prevalentemente specialistico, se si

escludono i nevi congeniti, essi hanno alcune caratteristiche comuni che permettono di identificarli come lesioni benigne nella maggioranza dei casi.

Tali caratteristiche possono essere così elencate:

- a) la simmetria: la lesione nevica benigna è armonica, di forma rotondeggiante ovalare
- b) i bordi sono regolari, a limiti netti con la cute sana circostante
- c) il colore delle singole lesioni può variare dal marrone chiaro al nero nello stesso soggetto ma il singolo nevo ha sempre una tonalità di colore uniforme
- d) la dimensione è nella grande maggioranza inferiore ai 6 mm
- e) l'evoluzione della lesione è lenta e progressiva nel tempo e di regola non è avvertita dal paziente

Il discostarsi di una lesione pigmentaria da una o più di queste caratteristiche può costituire un segnale di allarme utilizzabile per sospettare la lesione maligna.

### **Classificazione clinica del melanoma cutaneo**

L'aspetto clinico del melanoma cutaneo è legato alla sua fase di sviluppo e, almeno in parte, al suo istotipo. Infatti, pur essendo una malattia unica, si sviluppa in tempi diversi attraverso vari stadi di progressione in cui presenta aspetti clinici ed istologici diversi. Il clinico, tuttavia, di fronte a una lesione pigmentata, può solo descriverne la morfologia, distinguendo un melanoma piano, un melanoma cupoliforme ed un melanoma piano-cupoliforme.

#### ***Melanoma piano***

Il melanoma piano presenta due aspetti clinici che generalmente si susseguono: il melanoma piano non palpabile e il melanoma piano palpabile. Si presenta come una lesione di forma irregolare, di dimensioni solitamente superiori ai 6 mm, che all'anamnesi risulta essersi accresciuta in senso centrifugo (cosiddetta "crescita orizzontale"). È la variante più frequente (circa 80% dei casi) e può insorgere in qualsiasi sede cutanea e mucosa. Le caratteristiche semeiologiche che permettono il sospetto diagnostico sono riassunte nella formula mnemonica dell'ABCDE del melanoma (in contrasto con i caratteri già visti per i nevi melanocitici comuni) dove:

- A = ASIMMETRIA:** tracciando una linea immaginaria che sezioni la lesione nel centro le metà non sono sovrapponibili
- B = BORDI:** irregolari, indentati, "a carta geografica"
- C = COLORE:** nero o policromo con varie tonalità di marrone e coesistenza di rosso, rosa e blu
- D = DIMENSIONI:** superiori a quelle di un comune nevo melanocitico acquisito
- E = EVOLUZIONE:** la lesione è in evidente trasformazione morfologica nel tempo breve (mesi)
- E = ETÀ:** postpubere

#### ***Melanoma piano "non palpabile"***

Di dimensioni molto piccole al tronco ed agli arti (melanoma piano maculare), può diventare molto più grande al viso, in regione palmo-plantare ed alle mucose (melanoma piano in chiazza). In questa fase è dotato di aggressività biologica molto modesta. Se asportato chirurgicamente in modo adeguato porta alla guarigione clinica del paziente nella quasi totalità dei casi.

Le caratteristiche semeiologiche dell'ABCDE precedentemente descritte possono essere tutte presenti o presenti solo in parte. In particolare può mancare il criterio dimensionale (indicato con la lettera D). Anche se talvolta poco evidenti, sono invece presenti l'asimmetria, i bordi indentati ed il colore marrone scuro o nerastro, a volte irregolarmente distribuito.

Esistono numerose lesioni pigmentate benigne che possono mostrare caratteristiche morfologiche simili a quelle del melanoma piano non palpabile. Depone per il melanoma: il colore più intenso rispetto a quello degli altri nevi presenti nello stesso soggetto; l'età di insorgenza, di solito più avanzata rispetto a quella dei nevi comuni; la velocità di crescita con possibile raddoppio delle dimensioni in 6-8 mesi di una lesione di recente insorgenza. Nel dubbio è indispensabile l'invio del paziente ad un Centro di riferimento dove, dopo l'esecuzione di un esame dermoscopico, in assenza di una diagnosi clinica di benignità certa, si provvederà alla asportazione chirurgica della lesione ed alla verifica istologica.

#### ***Melanoma piano "palpabile"***

La lesione appare leggermente rilevata sul piano cutaneo e risulta pertanto "palpabile". Le dimensioni possono essere di diametro inferiore ad 1 cm (melanoma piano papuloso) od arrivare fino a molti cm (melanoma piano in placca).

Sono presenti, accentuate, le caratteristiche morfologiche precedentemente descritte per la fase maculare:

- forma decisamente asimmetrica, con aspetti bizzarri
- bordi con andamento irregolare ed indentato con aspetti a "carta geografica"
- colore bruno scuro o nerastro con aree rosee, rosse o grigiastre distribuite in modo disomogeneo
- superficie con disegno cutaneo accentuato o non apprezzabile, finemente desquamante, talvolta con aree erose ricoperte da squamo-croste.

In questa fase si comincia a vedere il fenomeno della regressione spontanea evidenziato dalla comparsa nel contesto del tumore di aree ipotrofiche di colorito bianco-grigiastro o del colore della pelle normale che donano alla lesione aspetti anulari od arciformi. Talvolta la regressione può essere totale, reliquando soltanto un'area ipocromica con la forma della neoplasia originale. La diagnosi di melanoma in questo caso si pone solo quando si evidenziano metastasi linfonodali o sistemiche.

#### ***Melanoma cupoliforme***

Meno frequente (circa il 18% dei casi) , compare su cute sana con localizzazione ubiquitaria e tende ad accrescersi prevalentemente in altezza (cosiddetta "crescita verticale"). Si presenta come una papula od un nodulo, di forma regolare emisferica, a superficie liscia, di colorito bruno-nerastro o nero-bluaastro, di consistenza carnosa, spesso eroso e sanguinante, ricoperto da squamocroste ematiche. I confini con la cute sana circostante sono sempre netti. La formula dell'ABCDE è, in questa forma, di scarsa utilità. Il pigmento può essere distribuito in modo irregolare fino ad essere del tutto assente (melanoma acromico): in questo caso, ad un esame clinico attento, è individuabile talvolta alla base della lesione una sfumatura nerastra ("fuga del pigmento") di grande aiuto per la corretta diagnosi clinica.

#### ***Melanoma piano-cupoliforme***

L'insorgenza di un elemento papuloso o nodulare nel contesto di un melanoma piano palpabile o non palpabile costituisce un evento molto frequente che si realizza spesso anche dopo anni dalla comparsa della lesione primitiva. Rappresenta quindi un aspetto evolutivo della neoplasia. Tutte le varianti cliniche possono essere circondate da "satelliti": piccoli noduli tumorali bruno-nerastri o acromici perilesionali, considerati metastasi locali a propagazione linfatica.

#### ***Associazione nevo melanocitico-melanoma***

Il melanoma può insorgere, oltre che su cute sana, su un nevo melanocitico congenito od acquisito od in contiguità con esso.

I possibili segnali di allarme di associazione del nevo con il melanoma sono:

- modificazione del colore
- improvvisa comparsa di una lesione rilevata (papula o nodulo)
- rapido aumento della dimensione o dello spessore
- erosione, gemizio sieroso, sanguinamento
- formazione conseguente di croste siero-ematiche od ematiche
- segni di flogosi · comparsa di sintomi soggettivi (prurito, senso di trafittura).

Si noti che cambiamenti di forma e di colore possono peraltro verificarsi in un nevo melanocitico anche per cause di natura benigna (follicolite intranevica, esposizione al sole, gravidanza , traumi accidentali ecc.).

#### **La microscopia in epiluminescenza nella diagnosi precoce del melanoma cutaneo**

La microscopia in epiluminescenza è una metodica diagnostica di recente introduzione che costituisce un valido ausilio nella diagnostica non invasiva del melanoma e delle altre neoformazioni pigmentate cutanee (2-4). L'esecuzione di tale metodica con uno strumento portatile chiamato dermatoscopio prende il nome di dermatoscopia o dermoscopia.

Il principio su cui si basa è quello della osservazione di una lesione pigmentata cutanea dopo applicazione sulla sua superficie di un olio (di cedro, di vaselina) che rende trasparente lo strato corneo consentendo la identificazione, dopo ingrandimento, di strutture pigmentate sottostanti non altrimenti rilevabili (2). Poichè esiste fra tali strutture pigmentate (parametri dermatoscopici) e le caratteristiche istologiche della lesione una precisa correlazione, l'esame dermatoscopico fornisce al dermatologo ulteriori elementi diagnostici che si aggiungono a quelli della sola osservazione clinica (5, 6). Studi formali eseguiti confrontando la efficienza diagnostica dell'esame clinico effettuato su immagini fotografiche con quella della dermoscopia hanno dimostrato che l'impiego di questa tecnica da parte di un osservatore esperto si accompagna ad un incremento della percentuale di diagnosi corrette che varia secondo il tipo di lesione, con un miglioramento diagnostico medio di circa il 10-15% (7-11).

È da sottolineare che l'esame con microscopia in epiluminescenza costituisce uno specifico atto diagnostico la cui esecuzione richiede una adeguata preparazione sia teorica che pratica dell'esaminatore. Studi formali sulla diagnostica del melanoma hanno infatti dimostrato che l'utilizzo della microscopia in epiluminescenza da parte di osservatori non sufficientemente addestrati può determinare una riduzione della loro capacità diagnostica, con un maggior rischio di falsi negativi (mancato riconoscimento del melanoma) rispetto al solo esame clinico (9).

La microscopia in epiluminescenza può essere eseguita con diverse strumentazioni ottiche. Quella più frequentemente utilizzata è il dermatoscopio manuale, portatile, delle dimensioni di un otoscopio, con ingrandimento fisso a 10x. I vantaggi di tale strumento sono la maneggevolezza, i costi contenuti, la buona qualità dell'immagine e le condizioni standard in cui tale immagine si ottiene. È disponibile anche uno specifico obiettivo per la documentazione fotografica.

Altre strumentazioni che possono essere impiegate sono: lo **stereomicroscopio**, binoculare, che dispone di più ingrandimenti ma risulta scarsamente maneggevole e dal costo elevato e il **videodermatoscopio**, costituito da una sonda (telecamera) collegata ad un computer mediante fibre ottiche. Quest'ultima strumentazione permette la archiviazione digitale e la possibilità di trasmissione a distanza dell'immagine (teledermatoscopia) (10).

L'impiego di programmi di analisi computerizzata dell'immagine finalizzati alla diagnosi automatica della lesione è da considerarsi limitato a fini di ricerca e al momento non utilizzabile nella pratica clinica (10).

La microscopia in epiluminescenza utilizza una semeiotica specifica, accettata a livello internazionale. Oltre alla semeiotica "standard", codificata in una Consensus Conference tenutasi ad Amburgo nel 1989, sono descritti in letteratura altri parametri dermatoscopici che derivano dall'esperienza maturata dalle diverse scuole dermatologiche e che in molti casi rappresentano un tentativo di accorpamento o di semplificazione della semeiotica standard (11, 13-15).

Il fondamento della semeiotica dermatoscopica è la concordanza fra parametri dermatoscopici e determinate strutture istologiche (Allegato 1, semeiotica standard e correlati istologici/Addendum) (12).

Alcuni parametri dermatoscopici sono specifici delle lesioni di natura melanocitaria (reticolo pigmentario, globuli marroni, strie radiali, pseudopodi), mentre altri si possono ritrovare in lesioni pigmentate sia melanocitarie che non melanocitarie. Nessuno di questi parametri è tuttavia specifico di malignità. Pertanto, la diagnosi dermatoscopica del melanoma non può fondarsi sulla identificazione di un singolo parametro bensì deve essere il risultato di una **analisi di pattern**, che deve tenere conto di più parametri dermatoscopici (12) e la cui efficienza diagnostica risente grandemente della esperienza dell'osservatore.

Il percorso mentale che porta alla diagnosi dermatoscopica prevede pertanto due fasi:

1. riconoscimento analitico di tutti i parametri presenti nella lesione e delle loro caratteristiche morfologiche. In linea generale si reperiscono più di frequente nei melanomi che nei nevi i seguenti caratteri dermoscopici: reticolo irregolare, prominente, che si interrompe bruscamente in periferia, pigmentazione diffusa irregolare, globuli marroni e punti neri irregolari, presenza di strie radiali, pseudopodi, area grigio-blu, velo biancastro, area bianca similcicatriziale
2. valutazione comparativa del loro valore diagnostico in una visione d'insieme in cui giova un ruolo fondamentale l'esperienza dell'osservatore.

Un settore di particolare interesse tuttora in fase di sviluppo è quello degli algoritmi dermoscopici finalizzati ad una più agevole diagnosi del melanoma. Tali algoritmi utilizzabili esclusivamente nel caso di lesioni melanocitarie costituiscono procedimenti diagnostici semplificati rispetto alla analisi di pattern nei quali non tutti i parametri dermoscopici bensì quelli associati a maggiore specificità diagnostica (bassa probabilità di falsi positivi) vengono presi in considerazione.

L'algoritmo più utilizzato è il cosiddetto ABCD dermoscopico (13), procedimento di calcolo semiquantitativo che culmina in un punteggio numerico attribuito sulla base di alcune caratteristiche dermoscopiche (asimmetria, interruzione netta del reticolo/pigmento ai bordi della lesione, numero di colori presenti, numero di strutture dermoscopiche) (Allegato 2/Addendum). A tale fine, la semeiotica standard è stata parzialmente modificata introducendo nuove variabili derivanti dall'accorpamento di alcuni parametri (ad es. le estroflessioni raggiate includono sia gli pseudopodi che le strie radiali, le aree prive di strutture includono la pigmentazione diffusa, la ipopigmentazione, la area grigio-blu e l'area bianca similcicatriziale). In base a tale algoritmo si ottiene mediante moltiplicazione dei punteggi parziali con fattori di correzione un punteggio dermoscopico totale (TDS) identificativo della natura della lesione: benigna con valori di TDS inferiore a 4.75, maligna con valori >5.45, dubbia con valori intermedi, da sottoporre a biopsia escissionale oppure a

controlli nel tempo. La sensibilità diagnostica di tale algoritmo è risultata del 92.8%, con una accuratezza diagnostica pari a 80% (Nachbar).

Altri algoritmi recentemente descritti in letteratura sono invece caratterizzati dalla separazione a fini diagnostici fra caratteri dermoscopic maggiori e minori.

Secondo l'algoritmo definito "7FFM" (seven features for melanoma) (14) che utilizza caratteri predittivi di malignità sono da considerarsi criteri maggiori per la diagnosi di melanoma i seguenti parametri: i) regressione-eritema, ii) strie radiali, iii) velogrigio-blu, iv) pseudopodi distribuiti irregolarmente, a cui viene attribuito un punteggio pari a 2. Criteri minori sono v) disomogeneità dermoscopia vi) reticolo pigmentario irregolare vii) interruzione netta alla periferia. A ciascun criterio minore viene attribuito un punteggio pari a 1. Viene considerato suggestivo per la diagnosi di melanoma un quadro dermoscopic con punteggio uguale o superiore a 2. La sensibilità diagnostica di tale algoritmo è risultata pari al 94.6% con una accuratezza del 87.6%.

Secondo l'algoritmo definito "Seven point check list" (15) sono da considerare criteri maggiori per la diagnosi dermoscopic di melanoma i seguenti parametri: i) reticolo pigmentario atipico (cioè irregolare o prominente) ii) area grigio-blu e iii) pattern vascolare atipico; a ciascuno di tali parametri viene attribuito un punteggio uguale a 2. Criteri minori (punteggio = 1) sono iv) estroflessioni raggiate (pseudopodi o strie radiali), v) pigmentazione diffusa a zolle distribuite irregolarmente vi) globuli o punti irregolari e vii) pattern di regressione (area bianca similcicatrizziale o peppering). Secondo questo algoritmo un punteggio complessivo pari o superiore a 3 è indicativo di melanoma con una sensibilità del 95% ed una accuratezza diagnostica del 64%.

L'impiego degli algoritmi diagnostici è da considerarsi vantaggioso rispetto alla analisi di pattern soprattutto nel caso di osservatori non molto esperti nella diagnosi dermoscopic del melanoma, risultando di più facile apprendimento rispetto alla modalità diagnostica standard.

### **Conferma diagnostica**

I casi di melanoma clinicamente e dermoscopicamente certi possono essere trattati con una adeguata exeresi chirurgica e successivo esame istologico.

Nei casi dubbi si deve procedere all'asportazione in toto della lesione con margine di cute sana dai bordi visibili della neoformazione di 2-3 mm (biopsia escissionale). La perdita di sostanza è riparata per scorrimento di lembi cutanei di contiguità, prima riavvicinati con sutura dermo-sottocutanea a punti staccati con materiale riassorbibile e poi con sutura del piano cutaneo con tecnica intradermica o a punti staccati. Il prelievo bioptico parziale (biopsia incisionale) è riservato a casi particolari e deve essere eseguito solo nei Centri di riferimento quando permane il dubbio clinico e la biopsia escissionale

comporterebbe interventi complessi o demolitivi (sede subungueale, nevi congeniti giganti, grandi lentiggini del volto, ecc.).

### **Diagnosi istopatologica**

Il melanoma è un tumore maligno che origina dai melanociti, cellule di derivazione dalla cresta neurale che migrano e si localizzano nello strato basale dell'epidermide o anche, raramente, in sede extracutanea. In circa il 12% dei pazienti con melanoma metastatico non si è in grado di identificare un melanoma primitivo che è verosimilmente totalmente regredito (15).

### ***Esame macroscopico***

L'esame macroscopico deve essere eseguito in modo da poter rilevare tutte quelle caratteristiche morfologiche che sono utili sia per la diagnosi sia per la definizione della prognosi. È pertanto importante che il materiale per l'esame macroscopico pervenga al patologo intatto (16).

La **descrizione macroscopica** deve comprendere:

- dimensioni del pezzo operatorio
- dimensioni della lesione pigmentata e non pigmentata, rilevata e piana
- dimensioni dell'eventuale porzione rilevata
- distanza della lesione dal margine di resezione
- aspetto dei margini (regolari, irregolari) e limiti (netti, sfumati) della lesione
- profilo della lesione (piana, cupoliforme, polipoide)
- colore ed eventuali aree di regressione
- eventuale presenza e dimensioni dell'ulcerazione
- spessore massimo (macroscopico) della lesione sulla superficie di taglio

È da evitare l'esame estemporaneo perioperatorio, su sezioni istologiche eseguite al microtomo criostato, di lesioni pigmentate cutanee clinicamente sospette per melanoma soprattutto se sono di diametro inferiore a 0,5 cm o se di dimensioni maggiori ma pianeggianti. L'esame estemporaneo può essere invece utilmente impiegato per valutare in casi selezionati, ad esempio nel melanoma dermoide, i margini di resezione o per accertare la presenza di una localizzazione metastatica cutanea, ai tessuti molli o parenchimali. Per quanto riguarda l'utilizzo dell'esame estemporaneo intraoperatorio nel linfonodo sentinella, le opinioni sono discordanti, ma la tendenza è verso l'utilizzo di sezioni istologiche definitive.

### ***Fissazione del materiale biotico operatorio***

Il fissativo consigliato è la formalina neutra tamponata (pH 7). Per studi particolari (immunocitochimica, microscopia elettronica, genetica, ecc.) può essere necessario eseguire prelievi a fresco, talora sterili, da stoccare a -80°C, facendo precedere un passaggio in azoto liquido. I fissativi coartanti e poco penetranti come alcool e Bouin sono da evitare.

**Informazioni cliniche essenziali per la diagnosi istologica**

- età e sesso del paziente
- sede della lesione
- durata della lesione e sue eventuali variazioni di forma, dimensione, superficie e colore
- tipo di prelievo: se prelievo bioptico di lesione più estesa o lesione intera
- precedenti anamnestici, in particolare quelli correlati con la lesione

**Refertazione**

- La diagnosi istopatologica (refertazione) deve obbligatoriamente comprendere (requisiti minimi):
- diagnosi di melanoma: se intraepiteliale (in situ) o invasivo (in fase di crescita orizzontale o verticale)
- istotipo (Tabella 2)
- spessore di invasione (secondo Breslow)
- regressione
- distanza dal margine di resezione

Il referto dovrebbe inoltre contenere (requisiti raccomandati):

- livello di invasione (secondo Clark)
- ulcerazione
- infiltrato linfocitico intra e peritumorale
- invasione vascolare
- indice mitotico
- neurotrofismo

Sono caratteri opzionali:

- tipo citologico
- pigmentazione

**Tabella 1. Classificazione istologica del melanoma**

<p><i>I. Melanoma invasivo con evidenza di fase di crescita orizzontale:</i></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Melanoma a diffusione superficiale</li><li>2. Melanoma tipo lentigo maligna</li><li>3. Melanoma tipo acrale-lentiginoso</li><li>4. Melanoma tipo mucoso-lentiginoso</li><li>5. Melanoma con fase di crescita orizzontale non classificabile</li></ol> <p><i>II. Melanoma invasivo senza evidenza di fase di crescita orizzontale:</i></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Melanoma nodulare</li></ol> <p><i>III. Melanomi invasivi rari:</i></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Melanoma desmoplastico</li></ol>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2. Melanoma neurotropico
3. Nevo blu maligno
4. Melanoma su nevo gigante, su nevo congenito o insorto nella componente dermica di nevi composti o intradermici

### **Immunocitochimica diagnostica**

Nessun anticorpo da solo è in grado di differenziare una lesione pigmentata benigna da una maligna ma alcuni anticorpi (proteina S-100, HMB 45, Mel 1, KBA.62, NK1 beteb, A/MART1, ecc.) possono essere utili, opportunamente interpretati, per la diagnosi istopatologica, in particolare di lesioni melanocitarie acromiche.

### **Caratteri biologici e aspetti morfologici**

#### ***Maturazione***

Per maturazione si intende un progressivo sviluppo e differenziazione cellulare, con evidenza di un gradiente di evoluzione lungo una direzione che va dalla giunzione dermo-epidermica al derma profondo. Nel melanoma non si osserva maturazione, che è invece presente nei nevi.

#### ***Estensione intraepiteliale pagetoide***

L'estensione intraepiteliale pagetoide è caratterizzata da una proliferazione discontinua di melanociti, isolati o a nidi, nell'epidermide sino agli strati più superficiali. Questo aspetto morfologico è spesso presente nel melanoma, in particolare nel melanoma a diffusione superficiale.

#### ***Progressione tumorale***

Nello sviluppo del melanoma, da una fase iniziale di proliferazione prevalentemente piatta, che si estende lungo il raggio di una circonferenza irregolare, si passa ad una fase di crescita verticale perpendicolare alla precedente con estensione in profondità. La prima fase di crescita orizzontale è caratterizzata, istologicamente, da una proliferazione intraepiteliale di melanociti atipici (melanoma in situ) o da un iniziale infiltrazione del derma papillare. In tale fase il melanoma anche se invasivo dimostra una prognosi buona. La comparsa della fase di crescita verticale, caratterizzata da una proliferazione espansiva dermica, non è una semplice estensione della neoplasia in profondità ma è la comparsa di un nuovo aspetto morfologico e di nuove caratteristiche biologiche nel melanoma il quale acquista capacità tumorigeniche con possibilità di diffusione; ovviamente più tale fase è avanzata, quindi più spesso è il melanoma, peggiore sarà la prognosi.

Il concetto di progressione tumorale è anche la base per la classificazione dei melanomi oltre che per la definizione della prognosi (microstadiazione). Infatti i differenti istotipi vengono definiti dalla presenza o meno della fase orizzontale e dalle sue caratteristiche morfologiche istopatologiche. La microstadiazione si basa sulla

determinazione della estensione del melanoma in funzione degli strati della cute (livello) e dello spessore della fase di crescita verticale.

***Livello di invasione (secondo Clark)***

- I livello melanoma confinato all'epidermide (melanoma in situ)
- II livello melanoma che infiltra senza riempire totalmente il derma papillare
- III livello melanoma che infiltra e riempie totalmente il derma papillare comprimendo il derma reticolare senza infiltrarlo
- IV livello melanoma che infiltra il derma reticolare
- V livello melanoma che infiltra il tessuto adiposo sottocutaneo

***Il livello di invasione ha minore correlazione con la prognosi rispetto allo spessore.***

***Spessore del melanoma (secondo Breslow)***

Lo spessore del melanoma viene determinato misurando (con oculare micrometrico) una sezione istologica del melanoma, dallo strato granuloso della cute (o dalla superficie ulcerata) al punto di massima infiltrazione. Nei casi di melanoma con focolaio dermico o ipodermico separato dalla componente invasiva, la misurazione deve comprendere lo spessore massimo del melanoma indipendentemente dal focolaio separato che deve essere segnalato come satellitosi microscopica.

***Regression e risposta immunologica locale***

Per regressione si intende la scomparsa totale o parziale di una neoplasia, senza alcuna terapia, o con una terapia generalmente considerata inadeguata a determinare alcuna influenza sulla storia naturale della neoplasia. Nella diagnosi istologica la segnalazione della regressione è un parametro morfologico importante in quanto la sua presenza potrebbe, almeno in alcuni casi, portare ad una determinazione erronea del livello e dello spessore del melanoma e pertanto ad una non corretta valutazione prognostica. Tuttavia i dati riportati in letteratura sul significato prognostico della regressione sono controversi.

Importante è la disposizione topografica dell'infiltrato linfocitario o meglio se i linfociti infiltrano (TILs) o non infiltrano, pur essendo presenti, il melanoma. I linfociti, per avere importanza prognostica, devono infiltrare e distruggere le cellule tumorali della crescita verticale del melanoma, mentre i linfociti presenti al di fuori della crescita verticale non hanno importanza nel determinare un effetto sulla storia naturale del tumore. La distribuzione dei TILs nella componente proliferativa verticale del melanoma, va identificata come brisk, non-brisk e absent. Vi è una buona evidenza che tali caratteri morfologici abbiano importanza nell'identificare gruppi di pazienti, con melanoma al I stadio, con differente prognosi. I TILs vengono definiti brisk se i linfociti sono presenti in modo diffuso nella componente proliferativa verticale del melanoma, non-brisk se sono

presenti solo pochi e piccoli focolai e absent quando i linfociti nella componente proliferativa verticale sono assenti (19). Lo studio della immunoreattività locale ha suggerito l'utilizzo di una terapia immunologica sperimentale capace di stimolare le difese del paziente.

### **Melanoma non invasivo**

Il melanoma non invasivo (o in situ) è un melanoma confinato all'epidermide, cioè senza evidenza di invasione dermica. I quadri sia clinici sia istopatologici che possono essere osservati sono differenti (Tabella 2), ma dal punto di vista prognostico sono simili, essendo clinicamente guariti se asportati interamente.

#### **Tabella 2. Melanoma non invasivo**

- Lentigo maligna
- Melanoma non invasivo, tipo a diffusione superficiale (pagetoide) o melanosi premaligna
- Melanoma non invasivo, acrale-lentiginoso
- Melanoma non invasivo, mucoso-lentiginoso

### **Melanoma invasivo in fase orizzontale**

Il melanoma invasivo in fase di crescita orizzontale è caratterizzato da una proliferazione intraepiteliale simile a quella del melanoma non invasivo e dalla presenza di singoli melanociti atipici o piccoli nidi (spesso non superiori a 20 cellule) che infiltrano la porzione più superficiale del derma papillare.

### **Melanoma invasivo con fase orizzontale e verticale**

Il melanoma invasivo con fase orizzontale e verticale è caratterizzato da una proliferazione intraepiteliale di melanociti atipici e da una componente invasiva dermica costituita da cellule tumorali con caratteri di crescita espansiva e citologicamente differente dalla componente neoplastica intraepiteliale. A seconda delle caratteristiche istologiche della componente proliferativa orizzontale distinguiamo differenti istotipi.

#### ***Melanoma tipo lentigo maligna***

Il melanoma tipo lentigo maligna è un tumore invasivo simile ad una efelide con uno o più aree rilevate nodulari nel suo contesto. I noduli sono costituiti da cellule neoplastiche spesso fusate e corrispondono alle aree di invasione, cioè alla componente proliferativa verticale. La componente proliferativa orizzontale ha i caratteri della lentigo maligna.

#### ***Melanoma a diffusione superficiale***

Il melanoma a diffusione superficiale è caratterizzato dalla presenza di cellule pagetoidi nella componente intraepidermica della fase di crescita orizzontale e da una commistione, in sede dermica, di cellule neoplastiche frequentemente di tipo epitelioidi associate ad altri

citotipi. Le cellule della componente verticale sono aggregate in nidi con caratteri di coesività. Spesso si osserva un tipo di crescita prevalente ed espansiva con una tendenza della proliferazione cellulare a svilupparsi in senso centrifugo.

## **Melanoma invasivo senza evidenza di fase di crescita orizzontale**

### ***Melanoma nodulare***

Con il termine di melanoma nodulare si definisce un tumore caratterizzato dalla comparsa di un nodulo che si sviluppa rapidamente senza evidenza di una componente intraepiteliale che si estenda al di là della componente dermica. La neoplasia è composta da aggregati di melanociti atipici che in modo variabile infiltrano il derma papillare, reticolare sino anche ad infiltrare il tessuto fibroadiposo sottocutaneo. Spesso è presente ulcerazione.

### **Varianti**

#### ***Melanoma desmoplastico***

Il melanoma desmoplastico è una particolare variante di melanoma la quale è caratterizzata da una proliferazione di cellule prevalentemente fusate, da diffusa produzione di collagene e differenziazione di tipo neurofibromatosa o Schwanniana. Si considera il melanoma desmoplastico come entità clinica ed istopatologica a sé stante in quanto questa neoplasia oltre a porre alcuni problemi di ordine diagnostico, clinico ed istopatologico, e terapeutico, dimostra una storia naturale che si discosta da quella di un melanoma comune.

#### ***Melanoma neurotropico***

Il melanoma neurotropico è un melanoma caratterizzato da invasione ed estensione perineurale. A differenza del melanoma desmoplastico, che può presentare invasione perineurale, nel melanoma neurotropico la desmoplasia è scarsa o assente mentre la proliferazione è caratterizzata da una marcata proliferazione di cellule fusate.

#### ***Nevo blu maligno***

Il nevo blu maligno è una entità rara definita dall'insorgenza di una proliferazione di melanociti dermici con caratteri citologici di malignità, su una preesistente melanocitosi dermica benigna, congenita o acquisita (nevo blu cellulato o tipico; nevo di Ota o Ito), o nella sede di escissione di un nevo blu.

#### ***Melanoma in nevo congenito***

Un melanoma in nevo congenito può insorgere in ogni momento della vita e in nevi di qualsiasi dimensione. Tuttavia la maggior parte dei melanomi in nevo congenito nascono su nevi giganti in bambini nei primi anni di vita. I melanomi su nevi congeniti piccoli o di dimensioni intermedie insorgono quasi esclusivamente negli adulti.

#### ***Melanoma nei bambini***

Il melanoma nei bambini è eccezionale e rappresenta circa lo 0.3-0.4% di tutti i melanomi e il 2% dei melanomi in pazienti di età inferiore a 20 anni. I caratteri morfologici macroscopici e istopatologici dei melanomi nei bambini non differiscono da quelli che insorgono in età adulta.

### **Melanoma metastatico**

All'incirca il 15-35% dei pazienti con melanoma cutaneo senza metastasi al momento della prima diagnosi (stadio I) sviluppano successivamente una ripresa di malattia o metastasi. La ripresa di malattia o metastasi avviene nella maggior parte dei casi con una estensione progressiva che può inizialmente interessare la sede del melanoma primitivo (recidiva locale), poi la cute interposta tra la sede del melanoma e la stazione linfonodale più vicina (metastasi in transit) quindi i linfonodi regionali ed in fine gli organi o altre sedi distanti. Metastasi possono localizzarsi in qualsiasi sede corporea, talora anche in sedi inusuali per una metastasi. Le metastasi linfonodali sono quelle più frequenti. Circa il 50% dei pazienti con metastasi presenta localizzazioni cutanee. Se le localizzazioni metastatiche sono entro 2 cm dal melanoma primitivo si parla di satelliti metastatici. La presenza di satellitosi è indice di rischio aumentato di ripresa di malattia e di metastasi linfonodali. Se la metastasi cutanea è posta oltre i 5 cm dal melanoma si identifica con il termine di metastasi in transit. La maggioranza dei pazienti con metastasi in transit svilupperà una disseminazione metastatica. Melanomi in fase avanzata (spessore elevato e IV o V livello) spesso presentano metastasi sottocutanee che talora possono essere anche molto distanti dalla sede del tumore primitivo. Nelle localizzazioni metastatiche è utile definire anche la presenza o meno di infiltrato linfoide nello stesso modo con cui viene definito quello presente nella componente verticale di un melanoma primitivo (20).

### **Terminologia e codificazione**

Secondo l'ICD-O (1990), la terminologia e codificazione delle lesioni melanocitiche maligne non invasive e dei melanomi invasivi è la seguente:

#### ***I. Lesioni melanocitiche maligne non invasive***

M 8720.2 Melanoma in situ  
M 8741.2 Melanosi precancerosa, NAS (T-173./CD44.)  
M 8742.2 Macchia melanotica di Hutchinson's (T-173./CD44.) o Lentigo maligna (T-173./CD44.)

#### ***II. Melanoma invasivo***

M 8720.3 Melanoma, NAS  
M 8721.3 Melanoma nodulare (T-173./CD44.)  
M 8723.3 Melanoma in regressione (T-173.3/CD44.)  
M 8741.3 Melanoma in melanosi precancerosa (T-173./CD44.)  
M 8743.3 Melanoma a diffusione superficiale (T-173./CD44.)  
M 8744.3 Melanoma acrale lentiginoso (T-173./CD44.)  
M 8745.3 Melanoma desmoplastico (T-173./CD44.) Melanoma neurotropico (T-173./CD44.)

M 8761.3 Melanoma in nevo gigante pigmentato (T-173./CD44.)  
M 8780.3 Nevo blu maligno (T-173./CD44.)

**III. Melanoma metastatico: M 8720.6**

### 3.1 ADDENDUM

**Allegato 1. Microscopia in epiluminescenza. Semeiotica standard e correlati istologici (Consensus Meeting, Hamburg 1989) (12)**

<i>Parametro dermoscopico</i>	<i>Correlato istologico</i>
<b>reticolo pigmentario</b> assente/presente, regolare/irregolare, delicato/prominente, a amaglie strette/larghe, sottile/spesso, che sfuma in periferia/che si interrompe bruscamente	<ul style="list-style-type: none"><li>• pigmentazione creste intercapillari</li></ul>
<b>pseudopodi</b> assenti/presenti, regolari/irregolari	<ul style="list-style-type: none"><li>• nidi giunzionali di cellule melanocitarie pigmentate confluenti alla periferia della lesioni</li></ul>
<b>strie radiali</b> assenti/presenti	<ul style="list-style-type: none"><li>• nidi giunzionali di cellule melanocitarie pigmentate distribuiti radialmente</li></ul>
<b>globuli marroni</b> assenti/presenti, omogenei/disomogenei per forma, dimensione, colore	<ul style="list-style-type: none"><li>• nidi di cellule melanocitarie pigmentate nel derma superficiale</li></ul>
<b>punti neri</b> assenti/presenti, omogenei/disomogenei per forma, dimensione, colore	<ul style="list-style-type: none"><li>• accumuli di melanina (cellule pigmentate) nello strato corneo</li></ul>
<b>velo biancastro</b> assente/presente	<ul style="list-style-type: none"><li>• ortocheratosi compatta e ipergranulosi</li></ul>
<b>area bianca simil-cicatriziale</b> assente/presente	<ul style="list-style-type: none"><li>• riduzione della quantità di melanina, fibrosi</li></ul>
<b>area grigio-blu</b> assente/presente	<ul style="list-style-type: none"><li>• cellule pigmentate (melanociti, melanofagi) associate a fibrosi dermica</li></ul>

<b>area ipo(de)pigmentata</b> assente/presente, regolare/irregolare	<ul style="list-style-type: none"> <li>riduzione della quantità di melanina rispetto alle aree circostanti</li> </ul>
<b>pigmentazione diffusa</b> assente/presente, regolare/irregolare	<ul style="list-style-type: none"> <li>presenza di melanina nei vari strati cutanei</li> </ul>
<b>pseudocisti cornee</b> assenti/presenti	<ul style="list-style-type: none"> <li>accumuli cornei intraepidermici</li> </ul>
<b>sbocchi simil-comedonici</b> assenti/presenti	<ul style="list-style-type: none"> <li>accumuli cornei intraepidermici superficiali</li> </ul>
<b>area rosso-blu</b> assente/presente	<ul style="list-style-type: none"> <li>spazi vascolari dilatati nel derma papillare</li> </ul>
<b>area a foglia d'acero</b> assente/presente	<ul style="list-style-type: none"> <li>ammassi di cellule epiteliali pigmentate</li> </ul>

**Allegato 2. Algoritmo per la diagnosi dermoscopica del melanoma secondo la regola dell'ABCD**

	<b>Punteggio parziale</b>	<b>Fattore di correzione</b>
<b>Asimmetria:</b> in nessuno, uno o due assi in base a colore, parametri e forma	0-2	1.3
<b>Bordi:</b> interruzione netta del pigmento alla periferia in 0-8 secondi	0-8	0.1
<b>Colore:</b> numero di colori presenti (colori possibili: bianco, nero, rosso, marrone chiaro, marrone scuro, grigio-blu)	1-6	0.5
<b>Differenti strutture:</b> numero di strutture dermoscopiche presenti (strutture possibili: reticolo pigmentario, estroflessioni raggiate, aree prive di strutture, globuli, punti)	1-5	0.5

Punteggio totale (Total Dermoscopic Score) derivante dalla somma dei punteggi parziali dopo moltiplicazione per i fattori di correzione:

**TDS <4.75:** *nevo*  
**TDS >5.45:** *melanoma*  
**Valori intermedi:** *lesione dubbia*

## BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

1. Cainelli T., et al. In "Manuale di dermatologia medica e chirurgica", McGrawHill Ed., 1997.
2. Goldman L. Some investigative studies of pigmented nevi with cutaneous microscopy. *J. Invest Dermatol.*, 16: 407-410, 1951.
3. Fritsch P., Pechlaner R. Differentiation of benign from malignant melanocytic lesions using incident light microscopy. In "Pathology of malignant melanoma", Ackerman AB. Ed, Masson, New York, 301-312, 1981.
4. Soyer H.P., Smolle J., Kerl H., Stettner H. Early diagnosis of malignant melanoma by surface microscopy. *Lancet*, 2: 803, 1987.
5. Yadav S., Vossaert K., Kopf A.W., et al. Histopathologic correlates of structures seen on dermoscopy (epiluminescence microscopy). *Am. J. Dermatopathol.*, 15: 297-305, 1993.
6. De Giorgi V., Carli P. Epiluminescence microscopy of pigmented skin lesions. In "European Handbook of dermatological treatments", ADKatsambas and TM Lotti eds, Springer-Verlag Berlin, 668-674, 1999.
7. Soyer H.P., Smolle J., Rieger E., Kerl H. Diagnostic reliability of dermoscopic criteria for detecting malignant melanoma. *Dermatology*, 190, 2530, 1995.
8. Carli P., De Giorgi V., Dosi G., Naldi L. Reliability and inter-observer agreement of dermoscopic diagnosis of melanoma and melanocytic naevi. *Eur. J. Cancer Prev.*, 7: 397-402, 1998.
9. Binder M., Schwarz M., Winkler A., et al. Epiluminescence microscopy. A useful tool for the diagnosis of pigmented skin lesions for formally trained dermatologists. *Arch Dermatol.*, 131: 286-291, 1995.
10. Kopf A., Elbaum M., Provost N. The use of dermoscopy and digital imaging in the diagnosis of cutaneous malignant melanoma. *Skin Res. Technol.*, 3: 1-7, 1997.
11. Menzies S.W., Ingvar C., McCarthy W.H. A sensitivity and specificity analysis of the surface microscopy features of invasive melanoma. *Melanoma Res.*, 6: 55-62, 1996.
12. Bahmer F.A., Fritsch P., Kreush J., et al. Terminology in surface microscopy. Consensus meeting of the Committee on analytical morphology of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Hamburg 1989. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 23: 1159-1162, 1990.
13. Nachbar F., Stolz W., Merkle T., et al. The ABCD rule of dermoscopy. High prospective value in the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 30: 551-559, 1994.
14. Dal Pozzo V., Benelli C., Roscetti E. The seven features for melanoma: a new dermoscopic algorithm for the diagnosis of malignant melanoma. *Eur. J. Dermatol.*, 9: 303-308, 1999.60 60.
15. Argenziano G., Fabbrocini G., Carli P., et al. Epiluminescence microscopy for the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. Comparison of the ABCD rule of dermoscopy and a new 7-point

- checklist based on pattern analysis. *Arch. Dermatol.*, 134: 1563-1570, 1998.
16. Balch C.M., Houghton A.H., Milton G.W., et al. *Cutaneous Melanoma (II Edition)*. J.B. Lippincot Company, 1992.
  17. Cascinelli N., Belli F., Andreoni B., et al. *Neoplasie della cute. Manuale di Oncologia Chirurgica*. 46: 817-851, 1994.
  18. Cascinelli N., Santinami M., Veronesi U. (Eds.) *Cutaneous Melanoma: Bio-logy and Management*. Masson Editore, 1990.
  19. Elder D.E. and Murphy G.F. *Melanocytic tumors of the skin. Atles of Tumor Pathology*. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, D.C. Third Series, Fascicle 2, 1991.
  20. Clemente C.G., Mihm M.C. Jr, Bufalino R., et al. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in vertical growth phase of primary cutaneous me- lanoma. *Cancer*, 77: 1303-1310, 1996.
  21. Mihm M.C. Jr, Clemente C.G., Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathological pro- gnostic indicator and an expression of local immune response. *Lab. Invest.*, 74: 43-47, 1996.

## 4. DIAGNOSI DELLE METASTASI (STADIAZIONE)

La presentazione clinica di un melanoma e il suo decorso possono essere estremamente variabili, perciò il medico deve conoscere il reale valore delle diverse metodiche diagnostiche, anche alla luce del rapporto costo-beneficio. Il melanoma può metastatizzare virtualmente in ogni organo o tessuto, ma la sede più frequentemente coinvolta è quella loco-regionale: cute, sottocute e linfonodi distrettuali in circa il 50-70% dei casi. Polmone (20-30%), fegato (15-20%) e cervello (15-20%) sono, nell'ordine, altre sedi di frequente metastatizzazione secondo quanto rilevato nelle diverse casistiche cliniche. Il tessuto osseo e il tratto gastro-intestinale sono sedi piuttosto infrequenti di localizzazione metastatica. Altri organi come tiroide, surreni, pancreas e mammella appaiono frequentemente coinvolti nelle casistiche autoptiche, ma hanno un decorso clinico generalmente silente. L'eventualità di sviluppare una metastasi è fortemente legata allo spessore del melanoma, alla sede e, secondo taluni, alla coesistenza di ulcerazione. Il 60-70% della comparsa di metastasi avviene entro i primi due anni e l'80% entro i primi tre anni dalla rimozione del melanoma primitivo. Tale evidenza si riflette comprensibilmente sugli schemi di follow-up e sul programma di indagini da eseguire.

### RUOLO DELLA VALUTAZIONE CLINICA

Dai dati esposti si comprende che la grande maggioranza delle metastasi da melanoma sono loco-regionali e perciò rilevabili con un adeguato esame clinico. Questo, insieme all'anamnesi relativa ai vari organi e sistemi, rappresenta l'indagine di gran lunga più utile, soprattutto in vista del fatto che oltre il 30% dei pazienti con metastasi linfonodali non manifesta ulteriori riprese, entro i 15 anni, se sottoposto ad un tempestivo e adeguato intervento chirurgico. Inoltre, deve essere sottolineato che ogni ulteriore approfondimento diagnostico deve essere motivato da segni e sintomi rilevati ad una scrupolosa anamnesi ed esame obiettivo. Nel paziente asintomatico l'accuratezza diagnostica degli screening è estremamente bassa e sono frequenti i falsi positivi.

### RUOLO DEGLI ESAMI DI LABORATORIO

L'incremento dei livelli sierici di latticodeidrogenasi (LDH) e/o della fosfatasi alcalina (AP) può essere indicativo di metastasi epatiche. Sono attualmente in fase di studio le potenzialità dell'analisi molecolare in RT-PCR (Polymerase Chain Reaction), tecnica a elevata sensibilità per l'individuazione di cellule di melanoma nel sangue periferico quale indicatore di possibili metastasi. La diagnosi di melanoma delle metastasi linfonodali e in organi profondi è spesso possibile mediante agoaspirazione ed esame citologico. In questi casi, l'utilizzo di anticorpi specifici consente la precisa identificazione della natura melanocitaria della lesione.

## **RUOLO DEGLI ESAMI RADIOLOGICI**

L'esame radiografico convenzionale del torace, con proiezioni postero-anteriori e laterali, è un'indagine sufficientemente sensibile e valida sotto il profilo costi-benefici, considerata la maggior frequenza delle metastasi polmonari tra le sedi viscerali. Nel caso di una radiografia del torace negativa, un uso routinario della TAC non è giustificato in quanto l'accuratezza diagnostica è superiore di solo circa l'1% e pertanto può produrre un'alta incidenza di falsi positivi, a fronte di costi elevati.

Analogamente, l'impiego della Tomografia Assiale Computerizzata (TAC) o della Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) non è di alcuna utilità nello studio del cervello, in assenza di specifici sintomi o segni. Per l'indagine sul fegato, l'ultrasonografia presenta una specificità simile a quella della TAC, ma è assai meno sensibile e, inoltre, i risultati possono essere fortemente inficiati da numerosi fattori, quali meteorismo addominale, esperienza dell'operatore e tipo di apparecchiature. Tuttavia, l'ecografia è una metodica molto più disponibile ed economica della TAC. Inoltre, questo esame può essere utile per la valutazione preoperatoria ed il follow up dei pazienti con melanoma. Infatti, se associato all'agobiopsia con esame citologico di lesioni ecograficamente sospette, può raggiungere una sensibilità del 92% e una specificità del 100% (1). Studi contrastografici dell'apparato digerente, soprattutto stomaco-duodeno e piccolo intestino, trovano indicazione solo a fronte di specifici segni o sintomi di coinvolgimento metastatico. Alla luce delle considerazioni esposte, TAC e RMN devono essere considerate utili alla definizione di situazioni cliniche specifiche e perciò indispensabili solo per una corretta programmazione terapeutica per i singoli pazienti.

## **RUOLO DELLA MEDICINA NUCLEARE**

La scintigrafia ossea rappresenta l'indagine più sensibile per l'individuazione di metastasi ossee, ma non trova indicazione nella stadiazione routinaria perché la sua positività è inferiore all'1% dei casi. Analogamente, la scintigrafia epatica e cerebrale non trovano indicazioni considerate la maggior sensibilità di TAC e RMN. Radioimmunosintigrafia e scintigrafia come indicatori positivi non hanno alcuna utilità pratica in ambito clinico.

Un cenno a parte merita la Tomografia a Emissione di Positroni (PET), attualmente disponibile in centri specializzati. La metodica fornisce bioimmagini ottenute dopo somministrazione di molecole di interesse biologico, marcate con isotopi emettitori di positroni. Il tracciante attualmente più utilizzato nella diagnostica oncologica è il 18-fluorodesossiglucosio (FDG) che attraversa la membrana cellulare e rimane intrappolato all'interno della cellula. Tra i vari tumori indagati, il melanoma è risultato essere la neoplasia maggiormente captante FDG. Rispetto ad altre procedure diagnostiche (ecografia, TAC, RMN), che forniscono una valutazione prevalentemente anatomico-morfologica di organi e strutture, la PET è capace di caratterizzare eventuali lesioni tumorali primitive o secondarie dal punto di vista biologico e metabolico, fornendo informazioni utili per la diagnosi e la stadiazione.

## STADIAZIONE DELLE MICROMETASTASI LINFONODALI ED IL CONCETTO DI DISSEZIONE SELETTIVA

Questo capitolo costituisce uno degli aspetti più innovativi della chirurgia oncologica degli ultimi anni. Esiste infatti oggi la possibilità di identificare con elevata precisione metastasi occulte da melanoma nei linfonodi regionali attraverso l'applicazione di una semplice, ma estremamente razionale procedura chirurgica: la biopsia del linfonodo sentinella.

La metodica rappresenta una grande innovazione diagnostica e terapeutica nella gestione dei pazienti affetti da melanoma in quanto permette di superare molti dei punti dibattuti negli anni passati e di ottimizzare il trattamento chirurgico di questi pazienti. Per capire la portata del problema è opportuno fare alcune considerazioni generali. La specifica malignità biologica del melanoma ha portato alcuni ad adottare negli anni passati un atteggiamento terapeutico particolarmente aggressivo e cioè la dissezione linfonodale estesa "profilattica" in pazienti con melanomi di spessore medio alto (1.5 mm) anche in assenza di malattia clinicamente documentabile. In realtà il trattamento chirurgico delle metastasi linfonodali da melanoma cutaneo è rimasto fino ad oggi un argomento controverso in ambito oncologico (2-4).

Un primo aspetto da considerare è l'alta incidenza delle complicanze postoperatorie che in alcune sedi anatomiche interessa il 40-50% dei casi trattati, ma molto più importante è l'evidenza emersa da studi prospettici multicentrici della non sostanziale rilevanza della dissezione profilattica nel migliorare il decorso clinico dei pazienti senza metastasi linfonodali da melanoma. In questo ambito sono da citare il Trial 1 del Gruppo Melanomi dell'OMS e uno studio simile condotto alla Mayo Clinic.

Nonostante questi dati, comunque, il trattamento profilattico si basa sulla evidenza bio-patologica della presenza di metastasi occulte nella stazione linfonodale regionale al momento dell'exeresi del tumore, nel 25-30% di pazienti con melanoma primitivo di spessore medio-alto (1.5 mm secondo Breslow). Questo dato non giustifica, secondo i sostenitori delle dissezioni terapeutiche, l'effettuazione di una dissezione elettiva spesso inutile, in tutti i casi di melanoma di spessore =1.5 mm, ma mette comunque in evidenza un elemento: l'esistenza di un piccolo gruppo di pazienti portatori di malattia occulta a livello linfonodale potenzialmente evolutiva (5).

La possibilità di individuare con mezzi poco invasivi questo particolare gruppo di pazienti candidati ad una dissezione linfonodale in assenza di segni clinici di malattia, costituisce pertanto un punto cruciale nella gestione terapeutica dei pazienti con melanoma. È a questo scopo che nel 1992 Morton e collaboratori (6) hanno messo a punto una semplice tecnica chirurgica finalizzata all'individuazione del primo linfonodo di drenaggio della linfa proveniente dall'area anatomica sede di sviluppo del melanoma. Per tale ragione questo linfonodo è stato definito **linfonodo sentinella**.

Dopo un'attenta valutazione dei risultati il W.H.O. Melanoma Programme ha deciso di indicare questa biopsia nei pazienti portatori di un melanoma di spessore (misurato secondo il metodo di Breslow) di almeno 1 mm, senza evidenza clinica di diffusione metastatica. Nella casistica di oltre 800 pazienti (7) raccolta da questo gruppo collaborativo internazionale solo un caso su 50 osservati aveva una localizzazione secondaria ad un linfonodo non sentinella. La biopsia del linfonodo sentinella è un intervento solo apparentemente semplice: in realtà i chirurghi operatori devono avere una specifica competenza. Un chirurgo oncologo esperto necessita di un periodo di apprendimento adeguato su almeno 50 biopsie prima di acquisire appieno la tecnica chirurgica.

La tecnica consiste nell'inoculo pre-operatorio di un colorante vitale (patent blu o isosulfan blu) alla periferia del melanoma, se ancora presente, o in sede pericicatrizziale in caso di escissione pregressa. Il colorante diffonde rapidamente lungo le vie linfatiche locali e si accumula nel primo linfonodo di drenaggio localizzato nella stazione di drenaggio linfatico regionale più vicina, colorandolo di blu intenso. Attualmente l'identificazione viene effettuata anche grazie all'inoculo perilesionale di colloidi marcati con isotopi radioattivi che vengono identificati nel linfonodo sentinella mediante specifici rilevatori in sede preoperatoria (mappa linfoscintigrafica con gamma camera) e intraoperatoria (biopsia guidata da radiosonda). L'associazione delle due metodiche consente una più elevata identificazione del linfonodo sentinella rispetto all'uso del solo colorante vitale (8, 9). Il linfonodo sentinella così identificato viene inviato quindi al patologo per una accurata valutazione istopatologica. Il presupposto della metodica è che la mancanza di malattia nel linfonodo sentinella deve corrispondere ad una mancanza di diffusione del melanoma anche negli altri linfonodi della regione. In questo modo dovrebbe essere possibile identificare quei casi, clinicamente silenti, interessati da metastasi occulte e quindi candidabili ad una dissezione che viene definita opportunamente selettiva per essere ben distinta da quelle profilattiche e terapeutiche degli anni passati.

Le varie esperienze fino ad oggi riportate sono sostanzialmente concordi nel confermare l'ipotesi biologica che la metastatizzazione linfonodale da melanoma non avviene in modo casuale ed imprevedibile bensì in maniera sequenziale (8-19). Nelle varie casistiche la percentuale di reperimento del linfonodo varia dal 70 al 100% a seconda della sede anatomica considerata, mentre l'incidenza di positività per diffusione di malattia nei linfonodi sentinella isolati varia dal 15 al 25%. È evidenza generalmente condivisa che la presenza di metastasi occulte nei linfonodi regionali "non sentinella", nei casi in cui il linfo nodo sentinella sia risultato negativo per localizzazione metastatica è decisamente bassa (1-3%). Questo dato in particolare mette in risalto nell'esperienza dei vari Autori una alta specificità e sensibilità della tecnica che quindi è oggi unanimamente accettata come metodo diagnostico affidabile, sicuro e poco invasivo per individuare pazienti con micrometastasi linfonodali da melanoma da sottoporre "selettivamente" ad una dissezione linfonodale radicale, quando la malattia a livello linfonodale è ancora clinicamente silente.

## STADIAZIONE

Le classificazioni proposte sono molteplici. Quella più frequentemente usata negli ultimi anni è definita AJCC/UICC (Tabella 1). Le altre due classificazioni più usate, il TNM e il M.D. Anderson Cancer Center, sono riportate negli Allegati 1 e 2.

La classificazione AJCC/UICC è attualmente in fase di rielaborazione e la nuova versione sarà probabilmente disponibile nell'anno 2000.

**Tabella 1. Classificazione AJCC/UICC**

Stadio	pT	Spessore	Livello	N	M
IA	pT1	≤ 0.75 mm	II	N0	M0
IB	pT2	> 0.75 - 1.5 mm	III	N0	M0
IIA	pT3	> 1.5 - 4.0 mm	IV	N0	M0
IIB	pT4	> 4.0 mm/satellitosi	V	N0	M0
IIIA	ogni pT	ogni spessore	ogni livello	- N1 regionali - diametro ≤ 3 cm	M0
IIIB	ogni pT	ogni spessore	ogni livello	- N2 regionali - diametro > 3 cm e/o metastasi in transit	M0
IV	ogni pT	ogni spessore	ogni livello	- ogni N	M1

### Allegato 1. Classificazione TNM

#### *Classificazione clinica*

#### **T Tumore primitivo**

L'estensione del tumore viene classificata dopo la sua asportazione

#### **N Linfonodi regionali**

Nx I linfonodi regionali non possono essere definiti.

N0 Non metastasi nei linfonodi regionali.

N1 Metastasi di 3 cm o meno nella dimensione massima in qualunque linfonodo regionale.

N2 Metastasi di dimensione massima superiore a 3 cm in qualunque linfonodo regionale e/o metastasi in transit (1)

N2a Metastasi di dimensione massima superiore a 3 cm.

N2b Metastasi in transit.

N2c Entrambe.

#### **M Metastasi a distanza**

- Mx La presenza di metastasi a distanza non può essere accertata.  
M0 Non metastasi a distanza.  
M1 Metastasi a distanza.  
M1a Metastasi nella cute o nel sottocute o nei linfonodi extra-regionali.  
M1b Metastasi viscerali.

*Classificazione patologica*

- pT Tumore primitivo (2)**  
pTx Il tumore primitivo non può essere definito.  
pT0 Non segni del tumore primitivo.  
pTis Melanoma in situ (livello 1 di Clark) (iperplasia melanocitica atipica, grave displasia melanocitica, non lesione maligna invasiva).  
pT1 Tumore che invade il derma papillare con spessore non superiore a 0.75 mm (livello II di Clark).  
pT2 Tumore con spessore superiore a 0.75 mm, ma inferiore a 1.5 mm e/o con invasione dell'interfaccia del derma papillare-reticolare (livello III di Clark).  
pT3 Tumore con spessore superiore a 1.5 mm ma inferiore a 4 mm e/o con invasione del derma reticolare (livello IV di Clark).  
pT3a Tumore con spessore superiore a 1.5 mm ma inferiore a 3.0 mm.  
pT3b Tumore con spessore superiore a 3.0 mm ma inferiore a 4 mm.  
pT4 Tumore con spessore superiore a 4.0 mm e/o con invasione del sottocute (livello V di Clark) e/o con satellitosi entro 2 cm dal tumore primitivo.  
pT4a Tumore con spessore superiore a 4.0 mm e/o con invasione del sottocute.  
pT4b Satelliti entro 2 cm dal tumore primitivo.
- pN** *Linfonodi regionali*: le categorie pN corrispondono alle categorie N.  
**pM** *Metastasi a distanza*: le categorie pM corrispondono alla categoria M.

*Suddivisione in stadi*

<b>Stadio I</b>	pT1	N0	M0
<b>Stadio II</b>	pT2	N0	M0
<b>Stadio III</b>	pT3	N0	M0
	Ogni pT	N1, N2	M0
<b>Stadio IV</b>	Ogni pT	Ogni N	M1

(1) Le metastasi in transito interessano la cute o il sottocute a più di 2 cm dal tumore primitivo e non al di là dei linfonodi regionali.

(2) In caso di discrepanza tra lo spessore del tumore e il livello, la categoria pT è basata sul reperto meno favorevole.

### **Allegato 2. Classificazione M.D. Anderson Cancer Center**

Stadio I	melanoma primitivo	A melanoma primitivo in sede B melanoma primitivo escisso C melanoma multiplo
Stadio II	recidiva locale e/o metastasi sottocutanee entro 3 cm dalla sede del primitivo	
Stadio III	metastasi regionali	A in transit B linfonodali C in transit + linfonodali regionali
Stadio IV	metastasi sistemiche	A solo cutanee B viscerali

### **Sopravvivenza dei pazienti con melanoma cutaneo ai diversi stadi (20)**

Stadio *	5 anni	10 anni
<b>I</b>	<b>97%</b>	<b>95%</b>
<b>II</b>	<b>76%</b>	<b>64%</b>
<b>III</b>	<b>41%</b>	<b>29%</b>
<b>IV</b>	<b>2%</b>	<b>--</b>

\* Classificazione AJCC

## BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

1. Rossi C.R., Seno A., Vecchiato A., et al. The impact of ultrasound scanning in staging and follow-up of patients with clinical stage I cutaneous melanoma. *Eur. J. Cancer*, 33: 200-203, 1997.
2. Veronesi U., Adamus J., Bandiera D.C., et al. Inefficacy of immediate node dissection in stage 1 melanoma of the limbs. *New Engl. J. Med.*, 297: 627- 630, 1977.
3. Balch C.M., Soong S.J., Bartolucci A.A., et al. Efficacy of an elective regional lymph node dissection of 1 to 4 mm thick melanomas for patients 60 years of age and younger. *Ann. Surg.*, 224: 255-266, 1996.
4. Cascinelli M., Morabito A., Santinami M., et al. Immediate or delayed dissection of regional nodes in patients with melanoma of the trunk: a randomized trial. *Lancet.*, 351: 793-796. 1998.
5. Reintgen D., Cruse C.W., Wells K., et al. The orderly progression of melanoma nodal metastases. *Ann. Surg.*, 220: 759-767, 1994.
6. Morton D.L., Wen D.R., Wong J.H., et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch. Surg.*, 127: 392-399, 1992.
7. Belli F., Lenisa L., Clemente C., et al. Sentinel node biopsy and selective dissection for melanoma nodal metastases. *Tumori*, 84: 24-28, 1998.
8. Kapteijn B.A.E., Nieweg O.E., Liem I., et al. Localising the sentinel node in cutaneous melanoma: gamma probe detection versus blue dye. *Ann. Surg. Oncol.*, 4: 156-160, 1997.
9. Van der Veen H., Hoekstra O.S., Paul M.A., et al. Gamma probe guided sentinel node biopsy to select patients with melanoma for lymphadenectomy. *Brit. J. Surg.*, 81: 1769-1770, 1994
10. Gershenwald J.E., Colome M.I., Lee J.E., et al. Patterns of recurrence following a negative sentinel lymph node biopsy in 243 patients with stage I or II melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 16: 2253-2260, 1998.
11. Wong J.H., Truelove K., Ko P., et al. Localization and resection of an in transit sentinel lymph node by use of lymphoscintigraphy, intraoperative lymphatic mapping, and a hand-held gamma probe. *Surgery*, 120: 114-116, 1996.
12. Ross M.I., Reintgen D., Balch CM. Selective lymphadenectomy: emerging role for lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the management of early stage melanoma. *Sem. Surg. Oncol.*, 9: 219-223, 1993.
13. Morton D.L., Wen D.R., Foshag L.J., et al. Intraoperative lymphatic mapping and selective cervical lymphadenectomy for early-stage melanomas of the head and neck. *J. Clin. Oncol.*, 11: 1751-1756, 1993.
14. Kapteijn B.A.E., Nieweg O.E., Valdés Olmos R.A., et al. Reproducibility of lymphoscintigraphy for lymphatic mapping in cutaneous melanoma. *J. Nucl. Med.*, 37: 972-975, 1996. 71.
15. Uren R.F., Howman-Giles RB., Thompson JF., et al. Lymphoscintigraphy to identify sentinel lymph nodes in patients with melanoma. *Melanoma Res.*, 4: 395-399, 1994.
16. Albertini J.J., Cruse C.W., Rapaport D., et al. Intraoperative radiolymphoscintigraphy improves sentinel lymph node

- identification for patients with melanoma. *Ann. Surg.*, 223: 217-224, 1996.
17. Uren R.F., Howman-Giles R., Thompson J.F., et al. Lymphatic drainage to triangular intermuscular space lymph nodes in melanoma on the back. *J. Nucl. Med.*, 37: 964-966, 1996.
  18. Strauss L.G., Conti P.S. The applications of PET in clinical oncology. *J. Nucl. Med.*, 42: 623-648, 1991.
  19. Gritters L.S., Francis I.R., Zasadny K.R., Wahl R.L. Initial assessment of positron emission tomography using 2-Fluorine-18-2-Deoxy-D-Glucose in the imaging of malignant melanoma. *J. Nucl. Med.*, 34: 1420-1427, 1993.
  20. Balch C.M. (Ed.). *Cutaneous melanoma*. Quality Medical Publishing, Inc. St. Luis, 1998

## 5. TRATTAMENTO

### TERAPIA CHIRURGICA DEL MELANOMA

#### *Trattamento del tumore primario*

A fronte di una diagnosi clinica certa di melanoma, la procedura chirurgica consiste nell'exeresi. La linea d'incisione cutanea deve essere ad 1 cm dai margini macroscopici del tumore e l'exeresi deve comprendere una più vasta area di tessuto sottocutaneo. Rispettando queste procedure la chirurgia è in grado di controllare localmente la malattia. Secondo l'esperienza del Gruppo Melanomi dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, un'adeguata escissione è seguita da recidiva locale in meno del 5% dei casi.

Se l'esame istologico della lesione primitiva riscontra uno spessore inferiore a 2 mm non si procede ad ulteriori radicalizzazioni. Infatti, i risultati di un trial condotto dal WHO Melanoma Programme hanno dimostrato che per melanomi spessi fino a 2 mm questa procedura non ha determinato alcun aumento di recidive locali e comparsa di metastasi regionali o a distanza. Per spessori superiori a 2 mm, invece, andrebbe escissa un'ulteriore area di cute e sottocute con un raggio di 1-2 cm dalla pregressa cicatrice.

L'eventuale rimozione della fascia muscolare è prognosticamente ininfluente. Nel caso di una precedente exeresi diagnostica di melanoma, la radicalizzazione chirurgica sarà condotta nel rispetto della stessa regola sopra esposta, misurando la distanza dalla cicatrice chirurgica della prima escissione entro 60 giorni.

### TRATTAMENTO DEI LINFONODI REGIONALI METASTATICI

#### *Biopsia del linfonodo sentinella e dissezione selettiva (1)*

Per i dettagli sulla metodologia volta alla rilevazione del linfonodo sentinella, si rimanda al Capitolo 4, mentre qui di seguito verranno fornite alcune informazioni e indicazioni pratiche per l'esecuzione della metodica nelle varie sedi anatomiche.

1. Sono candidabili a questa procedura tutti i pazienti con diagnosi accertata di melanoma di spessore superiore ad 1 mm. L'esecuzione della metodica per spessori inferiori o con melanoma ancora in sede e quindi di spessore non valutabile è a discrezione del curante.
2. L'uso della linfoscintigrafia dinamica preoperatoria è oggi considerato indispensabile e pertanto il paziente deve essere sottoposto all'esame dalle 4 alle 18 ore prima dell'intervento e non oltre in quanto, considerando i tempi di decadimento degli isotopi abitualmente utilizzati, l'utilizzo della sonda di rilevamento intraoperatoria (probe) è legato alla persistenza di una minima radioattività nella sede della biopsia.

3. I vantaggi legati all'uso della linfoscintigrafia dinamica sono inoltre la possibilità di conoscere preoperatoriamente l'esatta sede di distribuzione e il numero dei linfonodi da biopsiare. L'esame viene eseguito mediante iniezione intradermica del tracciante radiomarcato (nanocolloidi di albumina o sospensioni colloidali solforate marcate con Tc-99m) intorno alla cicatrice residua all'escissione del melanoma o intorno a questo se ancora presente.
4. L'identificazione intraoperatoria è oggi eseguita mediante l'uso di probe in grado di rilevare la presenza del tracciante all'interno del linfonodo. A questo si associa il metodo originariamente descritto da Morton che consiste nell'inoculo perilesionale di 1-1.5 cc di un colorante vitale (patent blu o iso-sulfan blu) subito prima dell'inizio dell'intervento chirurgico. Il linfonodo sentinella con questo metodo è identificabile per l'intensa colorazione azzurra del linfonodo stesso.
5. Una volta identificato il linfonodo sentinella, questo viene inviato al patologo per una valutazione del caso. In considerazione delle dimensioni estremamente piccole delle metastasi riscontrate in questi pazienti, i più sconsigliano di effettuare un esame estemporaneo intraoperatorio che spesso risulta falsamente negativo. Al contrario è oggi sempre più frequente in questi casi l'uso routinario dell'immunoistochimica in aggiunta alle colorazioni tradizionali, per una più facile identificazione delle micrometastasi intralinfonodali. In caso di positività del linfonodo il paziente deve essere sottoposto ad una linfadenectomia radicale.

---

(1) Dissezione "radicale" di una stazione linfonodale solo in pazienti con linfonodo sentinella positivo.

#### ***Modalità della dissezione linfonodale***

In tutti i casi in cui si documenta a livello clinico o patologico la presenza di una metastasi linfonodale regionale da melanoma è essenziale eseguire un'ampia e radicale dissezione dei linfonodi regionali. Dal punto di vista tecnico le sedi linfonodali di interesse pratico sono quelle cervicali, ascellari e inguinali. La frequenza di metastasi linfonodali in altre sedi, quali la poplitea con localizzazioni all'estremità laterale dei piedi e la epitrocleare con localizzazioni all'estremità mediale delle mani, è decisamente rara.

Tecnicamente gli interventi di linfadenectomia consistono quindi, a seconda della sede interessata, in:

a) dissezione radicale del collo comprendente i linfonodi sottomandibolari, laterocervicali superficiali e profondi e i linfonodi sopraclavari, risparmiando, dove possibile, il muscolo sternocleidomastoideo, la vena giugulare interna e il nervo accessorio spinale. Se la sede di insorgenza del melanoma primitivo è al volto o in regione temporale la dissezione radicale del collo deve essere completata con la parotidectomia (conservativa del nervo facciale) per la relativa frequenza di metastasi occulte in sede intraparotidea;

b) dissezione ascellare comprendente i linfonodi dei tre livelli ascellari con asportazione o meno del muscolo piccolo pettorale;

c) dissezione inguino-iliaca comprendente oltre ai linfonodi inguinali anche gli iliaci esterni e gli otturatori.

## **TERAPIA CHIRURGICA DELLE METASTASI A DISTANZA**

Il trattamento dei pazienti con metastasi a distanza è oggetto di vivace discussione: esiste un ragionevole accordo che pazienti portatori di una metastasi solitaria debbano essere considerati per un trattamento chirurgico, in quanto sembra essere l'unico approccio terapeutico ad offrire possibilità di sopravvivenza a lungo termine sia pure in una minoranza di soggetti.

A fronte di metastasi cosiddette in-transit localizzate agli arti e quando non esistano segni di diffusione in altre sedi, la scelta terapeutica elettiva è la perfusione regionale ipertermico-antiblastica. Nei casi stadio III AB (sec. M.D. Anderson) alla perfusione va associata la linfadenectomia radicale. Nei pazienti con localizzazioni a distanza non esiste, di regola, indicazione per l'approccio chirurgico, ma per un approccio radioterapico.

## **FOLLOW-UP**

### ***Stadi clinici I / II e III AJCC***

Un follow-up dei pazienti con melanoma, al fine di un riscontro precoce dell'eventuale ripresa di malattia, è necessario ed occupa una quota notevole delle risorse in questo settore. Purtroppo, non esistono studi che confrontino diversi schemi ed intensità di follow-up e ne quantifichino l'impatto sulla sopravvivenza. Si ritiene comunque che il piano di controllo debba essere modulato in relazione allo spessore del melanoma primitivo. Infatti, per melanomi <1mm di spessore, i controlli verranno programmati con cadenza annuale. Per melanomi >1mm i controlli verranno effettuati ogni 4 mesi per i primi tre anni, con cadenza semestrale fino al quinto anno e con cadenza annuale oltre il decimo anno dall'escissione del melanoma primitivo. La visita clinica potrà essere corredata da un controllo ecografico delle stazioni linfonodali potenzialmente interessate da una ripresa.

Nel corso dei primi cinque anni, i controlli clinico-ecografici potranno essere accompagnati da periodici controlli strumentali, ad esempio una radiografia del torace in due proiezioni e un'ecografia epatica una volta ogni 8 mesi nei primi tre anni ed una volta all'anno in seguito. Indagini addizionali o esami strumentali più sofisticati dovranno essere richiesti in presenza di sintomi o di segni di allarme, anamnestici o rilevati in occasione dei controlli.

## **BASI SCIENTIFICHE DELLA TERAPIA ADIUVANTE NEL MELANOMA**

Il melanoma è uno dei tumori per i quali è stata dimostrata l'esistenza di una reattività cellulo-mediata nonché la presenza di anticorpi diretti contro le cellule neoplastiche nei pazienti affetti da tale patologia (1-4). Infatti, nonostante la sua riconosciuta resistenza alla chemio e alla radioterapia, esistono numerose argomentazioni a favore del coinvolgimento del sistema immunitario dell'ospite:

- storia naturale della neoplasia, caratterizzata da lunghi periodi di remissione alternati ad improvvise quanto repentine disseminazioni metastatiche;
- possibilità non rara di regressioni spontanee;
- lunga durata, talvolta anche per anni, della fase intraepidermica della malattia;
- comparsa, in circa il 10% dei casi, di una vitiligo causata da una inspiegata distruzione di melanociti normali, attribuibile verosimilmente ad una reazione immunitaria contro antigeni comuni a melanociti e cellule trasformate (5);
- non evidenziabilità della lesione primitiva in circa il 4% dei melanomi disseminati, ovvero nel 12% dei casi che si manifestano in prima istanza con metastasi linfonodali e/o viscerali (6);
- frequente espressione, da parte delle cellule trasformate, oltre che degli antigeni tumore-associati (7, 8) di antigeni di classe II codificati dalla regione D (DR in particolare, ma anche DQ) del complesso HLA (8, 9), notoriamente coinvolti nelle interazioni cellulari della risposta immunitaria;
- osservazione che i pazienti con un numero assoluto di cellule T costantemente superiore a 900 cell./mmc hanno una sopravvivenza a 7 anni significativamente più lunga dei pazienti con valori costantemente inferiori (10).

Queste considerazioni giustificano i numerosi studi immunologici effettuati e i risultati ottenuti con l'impiego della sola immunoterapia nel trattamento di pazienti affetti da melanoma.

Alcuni studi hanno dimostrato che nel melanoma le probabilità di guarigione a seguito del trattamento chirurgico sono funzione dello spessore massimo del melanoma calcolato secondo Breslow. Considerando gruppi di pazienti con lesioni di spessore progressivamente crescente di 1 mm, le probabilità di guarigione diminuiscono con l'aumentare dello spessore di Breslow. Infatti una delle insidie maggiori nel decorso del melanoma è rappresentata dalla ripresa di malattia dovuta a focolai di micrometastasi già presenti al momento del trattamento primario del tumore. Lo scopo della terapia adiuvante è di distruggere le eventuali micrometastasi presenti al momento della diagnosi e di aumentare così le probabilità di guarigione. Il sistema immunitario, attraverso le cellule Natural Killer e T-citotossiche, è in grado di contrastare la crescita tumorale e questa azione è tanto più efficace quanto minore è il numero delle cellule maligne da aggredire. Per tale motivo qualsiasi trattamento immunoterapico risulta più efficace in presenza di malattia residua minima che non in caso di neoplasia avanzata con una massa tumorale di notevoli dimensioni.

## **LA TERAPIA DEL MELANOMA CON MODIFICATORI DELLA RISPOSTA BIOLOGICA**

In virtù delle caratteristiche "immunologiche" del melanoma, in passato sono stati intrapresi vari tentativi di immunoterapia, vale a dire di utilizzo di sostanze in grado di stimolare le difese immunitarie (BRMs Biological Response Modifiers - modificatori della risposta biologica) al fine di incrementare l'attività citotossica sia diretta che indiretta delle cellule linfocitarie. Nella Tabella 1 sono riportati i vari BRMs testati nell'immunoterapia del melanoma.

**Tabella 1. BRMs utilizzati nell'immunoterapia del melanoma**

- Bacillo di Calmette-Guérin
- *Corynebacterium parvum*
- Anticorpi monoclonali
- Interleuchine
- Interferoni

L'interferone-a (IFN-a) ha rappresentato sicuramente il BRM più idoneo, nella valutazione del rapporto efficacia/tossicità, per una terapia adiuvante del melanoma.

La prima sperimentazione randomizzata è stata condotta su pazienti con melanoma localmente avanzato e/o con metastasi ai linfonodi regionali, sottoposti a chirurgia "radicale". I risultati, pubblicati nel 1995 (11), hanno dimostrato una sopravvivenza libera da malattia e globale non diversa per i pazienti trattati con IFN-a (20 $\mu$ /m<sup>2</sup> s.c. 3/sett. per 3 mesi) o sottoposti a sola terapia chirurgica. Nello studio dell'Estearn Cooperative Oncology Group, successivamente pubblicato nel 1996 (12), è stato invece dimostrato che la dose massima tollerabile di IFN-a somministrata per 12 mesi dopo l'intervento chirurgico radicale sarebbe in grado di migliorare sia la sopravvivenza libera da malattia che globale in un gruppo di pazienti con melanoma ad uno stadio clinico confrontabile a quello dello studio precedentemente menzionato.

I risultati preliminari del Trial 16 del WHO Melanoma Programme (13) hanno indicato l'inefficacia terapeutica dell'IFN-a somministrato alla dose di 3  $\mu$  s.c. per tre volte la settimana per 3 anni dalla terapia chirurgica "radicale" di metastasi linfonodali da melanoma, diagnosticabili clinicamente. Disponibili anche i risultati di uno studio che ha confrontato tre gruppi di pazienti allo stadio II B-III (14) trattati 1) solo chirurgicamente; 2) con IFN-a alla dose massima tollerabile dopo chirurgia; 3) con basse dosi di IFN-a (3  $\mu$  s.c. 3/sett.) per due anni dopo chirurgia. In questo studio si è osservato un miglioramento della sopravvivenza libera dalla malattia per i soggetti trattati con dose massima tollerabile di interferone, ma nessuna modificazione della sopravvivenza globale.

Infine due studi pubblicati nel 1998 (15, 16) condotti su pazienti con melanoma localmente avanzato (stadio II B), senza metastasi ai linfonodi regionali, hanno dimostrato un miglioramento della sopravvivenza libera dalla malattia, ma non di quella globale, dopo trattamento post-chirurgico con IFN-a a basse dosi (3  $\mu$  s.c. 3/sett.) per un periodo di 12-18 mesi.

Sulla base di queste conoscenze si può concludere che non esiste una indicazione per un trattamento "adiuvante" con interferone alfa per i pazienti con metastasi ai linfonodi regionali. Non sembra infatti ragionevole esporre i pazienti alla rilevante tossicità del trattamento con dose massima tollerabile di interferone alfa senza un beneficio sulla sopravvivenza a lungo termine. L'inefficacia della somministrazione post-chirurgica dell'interferone alfa a basse dosi in questi soggetti è adeguatamente documentata. Più difficile è trarre conclusioni per i pazienti con un melanoma di spessore superiore a 1,5 mm e senza metastasi linfonodali. La moderata tossicità potrebbe giustificare il trattamento con basse dosi per 12 mesi per ottenere un intervallo libero da malattia consistentemente più lungo, pur senza un suo beneficio sulla sopravvivenza globale.

## TRATTAMENTO DELLA MALATTIA METASTATICA

Il trattamento sistemico della malattia in fase disseminata ha tutt'oggi finalità puramente palliative, inducendo regressioni tumorali, per lo più parziali, in una minoranza di casi, senza ottenere un significativo impatto sulla sopravvivenza. Pertanto è necessario che i pazienti con malattia metastatica vengano indirizzati a Centri dove possano essere inseriti in programmi terapeutici sperimentali. Le opzioni terapeutiche attualmente disponibili sono la chemioterapia e l'immunoterapia impiegate singolarmente o in combinazione.

## CHEMIOTERAPIA

### *Monochemioterapia*

La dacarbazina (dimetil-triazeno-imidazolcarbrossamide, DTIC) rimane il chemioterapico singolarmente più attivo. Questo agente alchilante è in grado di indurre regressioni tumorali in circa il 20% dei pazienti, raramente complete (3% dei casi) e della durata mediana di 2-6 mesi (17). Le sedi più responsive sono i tessuti molli (cute, sottocute e linfonodi) ed i polmoni, del tutto infrequenti sono le regressioni di metastasi epatiche, ossee e cerebrali. Solo il 2% dei pazienti trattati con DTIC ottiene una remissione completa duratura, con una sopravvivenza libera da malattia superiore ai 6 anni (18). I principali effetti collaterali sono a carico dell'apparato gastroenterico (nausea e vomito) ed, analogamente alla fotosensibilità, si osservano soprattutto quando vengono impiegate singole dosi elevate. Eccezionale è l'insorgenza di sindrome veno-occlusiva epatica, a patogenesi ancora sconosciuta ed evoluzione per lo più fatale. È in fase di valutazione il derivato imidazotetrazinico temozolomide, sottoposto in vivo a conversione spontanea in monometil-5-triazeno-imidazolcarbrossamide, il metabolita attivo del DTIC. Risultati preliminari di uno studio multicentrico randomizzato indicano che questo nuovo agente ha un'attività antitumorale almeno sovrapponibile a quella del DTIC (13.5% vs. 12% di risposte obiettive) (19). Vantaggi della temozolomide rispetto al DTIC sono rappresentati, oltre che dall'assenza di attivazione metabolica nel fegato, dalla biodisponibilità orale e dalla capacità di penetrazione nel Sistema Nervoso Centrale. Le nitrosouree (carmustina o BCNU, lomustina o CCNU, semustina o metil-CCNU e fotemustina) sono il secondo gruppo di chemioterapici singolarmente attivi, più estesamente studiati. Questi agenti inducono risposte in percentuali

variabili dal 13% al 22% (17). La principale limitazione al loro impiego è rappresentata dalla mielotossicità ritardata e cumulativa, in particolare la piastrinopenia. Nonostante la liposolubilità, le nitrosouree non si sono dimostrate efficaci contro le metastasi cerebrali, ad eccezione forse della fotemustina.

Altri agenti chemioterapici presentano una limitata attività nel melanoma metastatico, inducendo risposte obiettive nel 10-15% dei casi. Tra gli alcaloidi della vinca il composto più studiato è stato la vindesina, un derivato semisintetico della vinblastina, che determina regressioni tumorali nel 14% dei casi, quando somministrato in modo intermittente per via endovenosa rapida (17). I complessi di coordinazione del platino cisplatino (CDDP) e carboplatino hanno indotto risposte obiettive nel 15-16% dei pazienti trattati (20). Tuttavia l'impiego di CDDP in monochemioterapia è stato deludente, essendo caratterizzato da rare remissioni tumorali complete, generalmente di durata non superiore ai 3 mesi (17).

Più recente è la valutazione dell'attività dei taxani, paclitaxel e docetaxel, in pazienti con malattia metastatica, dove sono state osservate risposte obiettive nel 16-17% dei casi (17). Si tratta, comunque, di dati preliminari che richiedono una conferma su casistiche più ampie.

### ***Polichemioterapia***

Alla luce della modesta attività antitumorale della monochemioterapia, sono stati utilizzati regimi di combinazione di farmaci singolarmente attivi nell'ambito di studi monoistituzionali ottenendo risposte obiettive nel 30-50% dei pazienti (21). In particolare, il regime CVD, che prevede l'associazione di DTIC, CDDP ed un alcaloide della vinca, quale la vinblastina (nella versione sviluppata al M.D. Anderson Cancer Center di Houston) o la vindesina (nella versione adottata in Italia dal gruppo BR.EM.I.M.) induce remissioni obiettive in circa il 35% dei casi (22, 23). Occorre sottolineare che la maggior parte delle risposte ottenute con la polichemioterapia sono risultate di durata breve e simile a quelle osservate con l'impiego di singoli farmaci, a fronte, tuttavia, di un netto incremento degli effetti collaterali. Tale osservazione clinica ha trovato riscontro nei risultati di uno studio randomizzato dell'ECOG, recentemente pubblicato, che mostrano come l'associazione di CDDP, BCNU, DTIC e tamoxifene (regime Dartmouth) non sia significativamente superiore al solo DTIC in termini di risposte e sopravvivenza (24).

Sebbene l'antiestrogeno tamoxifene (TAM) non sia un farmaco singolarmente attivo nel melanoma metastatico, è stata da più parti sostenuta la sua efficacia in associazione alla chemioterapia (21) attribuendo il beneficio ad un potenziamento dell'azione degli agenti citotossici, piuttosto che alla sua azione antiestrogenica. In uno studio italiano è stata evidenziata la superiorità dell'associazione di DTIC ed antiestrogeno rispetto al solo DTIC, in termini di risposte e sopravvivenza. Tuttavia, questo risultato non è stato successivamente confermato (25-29). Infine, la chemioterapia ad alte

dosi, con impiego di agenti chemioterapici diversi, singolarmente od in associazione e con trapianto di midollo osseo è stata utilizzata su casistiche limitate di pazienti. Sono state osservate risposte obiettive nel 53% dei casi, ma raramente si è trattato di remissioni complete durature (20). Pertanto la chemioterapia ad alte dosi nel melanoma metastatico rimane un approccio terapeutico sperimentale.

## IMMUNOTERAPIA

L'interferone-alfa (IFN- $\alpha$ ) e l'interleuchina-2 (IL-2) sono state le citochine più estesamente studiate.

Complessivamente l'IFN- $\alpha$  ha indotto risposte obiettive in circa il 13% dei pazienti, con il 5% di remissioni complete e spesso durature (17). L'efficacia terapeutica è stata osservata a tutte le posologie e modalità di somministrazione impiegate e pertanto non è possibile definire lo schema di somministrazione ottimale.

L'IL-2, a differenza dell'IFN- $\alpha$ , non ha alcun effetto citostatico o citotossico diretto sulle cellule tumorali, ma immunomodulato attraverso una serie di eventi, quali la stimolazione di cellule effettrici, linfociti T citotossici, cellule NK (Natural Killer) e cellule LAK (Lymphokine-Activated Killer). L'IL-2, somministrata ad alte dosi in bolo per via endovenosa (dosaggio impiegato: 70.000-720.000 UI/Kg ogni 8 ore), è in grado di indurre risposte obiettive in circa il 10-17% dei pazienti. Tale trattamento, pur gravato da marcata tossicità cardiovascolare e renale, ha indotto una piccola, ma incoraggiante percentuale di risposte complete di lunga durata (30). Inoltre, la somministrazione della citochina in infusione continua sembra associata ad effetti collaterali meno severi (31). È in corso di valutazione l'efficacia della somministrazione per via sottocutanea. D'altra parte, le variazioni indotte dall'IL-2 sull'immunità umorale dei pazienti, utilizzando questa via di somministrazione, non sono risultate correlate con le risposte cliniche osservate (32). Nonostante risultati preliminari promettenti, non è stato confermato il beneficio terapeutico dell'associazione di IL-2 ed IFN- $\alpha$  rispetto a quello ottenuto con i due singoli immunoterapici. L'impiego di IL-2 associata a reinfusione di linfociti attivati in vitro (immunoterapia adottiva) è una metodica piuttosto complessa e costosa, utilizzata, al momento, solo a scopo sperimentale. In particolare, sono state descritte esperienze di reinfusione di TIL (Tumor-Infiltrating Lymphocytes) in pazienti con malattia in fase avanzata (34% di risposte obiettive) e, come trattamento "precauzionale", dopo asportazione radicale di metastasi a distanza (31, 33-35).

## CHEMIO-IMMUNOTERAPIA

Il razionale dell'associazione di chemioterapia ed immunoterapia (biochemioterapia) consiste nella: 1) possibilità di interazioni sinergiche o additive tra le due modalità terapeutiche; 2) combinazione di agenti citotossici ed immunoterapici con diversi meccanismi di azione senza induzione di resistenza crociata; 3) spettri di tossicità in gran parte non sovrapponibili (36). Nessun

vantaggio è stato ottenuto con l'impiego di IFN-a in combinazione con CDDP, alcaloidi della vinca o nitrosouree, mentre uno studio randomizzato dell'ECOG ha di recente dimostrato che l'associazione con DTIC non migliora risposte e sopravvivenza rispetto al solo chemioterapico, a fronte di una maggiore tossicità (27, 36).

La biochemioterapia con IL-2 e DTIC è risultata gravata da notevole tossicità, con risposte obiettive solo nel 13-33% dei casi (21). Risultati più incoraggianti sono stati osservati in studi di associazione del CDDP o regimi polichemioterapici contenenti questo agente e di IL-2±IFN-a. In particolare, al M.D. Anderson Cancer Center è stata sviluppata una biochemioterapia che utilizza il regime CVD in associazione ad IFN-a ed IL-2 (somministrata in infusione continua per 4 giorni) e, allo scopo di definire la migliore combinazione tra i due approcci terapeutici, sono state studiate diverse modalità di somministrazione, alternante, sequenziale e concomitante. Il regime "sequenziale" e quello "concomitante" sono risultati sostanzialmente sovrapponibili in termini di efficacia antitumorale, essendo in grado di indurre remissioni obiettive in oltre il 60% dei casi, di cui un 23% di risposte complete, alcune delle quali di lunga durata (37, 38). Inoltre uno degli aspetti salienti di questa esperienza monoistituzionale è rappresentato dal fatto che il 10% delle risposte complete osservate sono state di lunga durata.

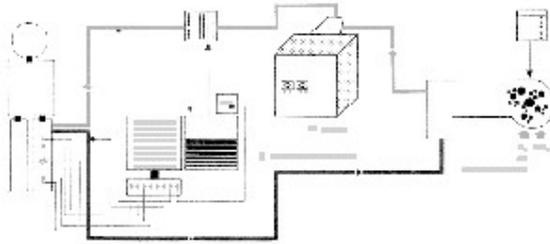
L'evidenza complessiva derivante dall'impiego della biochemioterapia in circa 400 pazienti indica un tasso di risposta del 50%, con un'incidenza di remissioni complete del 10-20% ed una sopravvivenza mediana di 11-12 mesi (36). Occorre, tuttavia, sottolineare che la biochemioterapia determina un numero di risposte più elevato rispetto ai singoli trattamenti impiegati, tuttavia con effetti collaterali che ne limitano pesantemente l'applicazione su vasta scala. Questo aspetto ha stimolato sia la formulazione di regimi modificati che il ricorso alla somministrazione sottocutanea di IL-2, al fine di individuare trattamenti meno tossici e fattibili ambulatorialmente. Risultati preliminari indicano una migliore tollerabilità della somministrazione sottocutanea, senza apparenti ripercussioni negative sull'efficacia del trattamento (21, 23, 39). In conclusione, allo stato dell'arte la biochemioterapia deve essere considerata un trattamento sperimentale, in attesa che studi clinici randomizzati dimostrino il reale beneficio di questa strategia terapeutica.

La perfusione ipertermico-antiblastica (40-43) è il trattamento elettivo per il melanoma degli arti con metastasi cosiddette "in transit". Consiste nell'isolare la circolazione di un arto, di regola a livello dei vasi iliaci esterni per gli arti inferiori e dei vasi ascellari per gli arti superiori, e nel collegarla ad una macchina cuore-polmoni cui è associato uno scambiatore di calore in grado di consentire una temperatura di 41.5°C a livello del tessuto tumorale (Fig. 1). In questo circuito isolato, mantenuto alla temperatura di 42-42.5°C, viene iniettata una dose di farmaco (generalmente L-PAM) circa 10 volte superiore alla dose massima tollerata dopo somministrazione per via sistemica. Con tale trattamento, come dimostrato da numerosi studi, si ottiene una elevata frequenza di risposte complete a livello del distretto perfuso che si ripercuote anche in una più elevata sopravvivenza (42-46). Evidenze preliminari dimostrerebbero

inoltre la possibilità di raggiungere una percentuale di risposte complete e parziali attorno al 100% in seguito al trattamento ipertermico con farmaci e TNF. Questa sperimentazione terapeutica è in corso e non sono ancora disponibili dati definitivi (47).

Quando l'isolamento vascolare non è possibile (ad esempio, per pregresso intervento di svuotamento linfonodale inguino-iliaco otturatorio dell'arto da perforare) può essere utilizzata la metodica della perfusione in condizione ipossica, correntemente definita Stop-Flow (48, 49). Con questa tecnica si ottengono risultati, secondo alcuni studi, simili a quelli ottenibili con la perfusione tradizionale. La tossicità locale è meno importante, mentre quella generale è più marcata essendo l'isolamento del distretto vascolare meno completo.

**Figura 1. Schema del circuito extra-corporeo**



## BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

1. Hellstrom I., Hellstrom K.E., Pierce G.E., Yang J.P. Cellular and humoral immunity to different types of human neoplasms. *Nature*, 220: 1352-1354, 1968.
2. Morton D.L., Malmgren R.A., Holmes E.C., Ketcham A.S. Demonstration of antibodies against human malignant melanoma by immunofluorescence. *Surgery*, 64: 233-240, 1968.
3. Lewis M.G., Ikonopisov R.L., Nairn R.C., et al. Tumour-specific antibodies in human malignant melanoma and their relationship to the extent of the disease. *Brit. Med. J.*, 3: 547-552, 1969.
4. Fossati G., Colnaghi M.I., Porta G.D., Cascinelli N., Veronesi U. Cellular and humoral immunity against human malignant melanoma. *Int. J. Cancer*, 8: 344-350, 1971.
5. Levine N., Meyskens F.L. Topical vitamin-A-acid therapy for cutaneous metastatic melanoma. *Lancet*, 2: 224-226, 1980.
6. Giuliano A.E., Moseley H.S., Morton D.L. Clinical aspects of unknown primary melanoma. *Ann. Surg.*, 191: 98-104, 1980.
7. Wilson B.S., Giacomini P., Imai K., et al. Human melanoma-associated antigens identified with monoclonal antibodies. *Ric. Clin. Lab.*, 12: 517-538, 1982.
8. Parmiani G., Fossati G., Taramelli D., et al. Autologous cellular immune response to primary and metastatic human melanomas and its regulation by DR antigens expressed on tumor cells. *Cancer Met. Rev.*, 4: 7-26, 1985.
9. Bernengo M.G., Lisa F., Meregalli M., et al. The prognostic value of T-lymphocyte levels in malignant melanoma. A five-year follow-up. *Cancer*, 52: 1841-1848, 1983.
10. Bernengo M.G., Lisa F., Meregalli M., Doveil G.C. Changes in T and B lymphocyte subpopulations before, during and after chemotherapy for malignant melanoma. *Int. J. Tissue React.*, 6: 505-511, 1984.
11. Creagan E.T., Dalton R.J., Ahmann D.L., et al. Randomized surgical adjuvant clinical trial of recombinant interferon alfa 2a in selected patients with malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 13: 2776-2783, 1995.
12. Kirkwood J.M., Strawderman M.H., Ernstoff M.S., et al. Interferon alfa 2b adjuvant therapy of high risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J. Clin. Oncol.*, 14: 7-17, 1996.
13. Cascinelli N. Evaluation of efficacy of adjuvant rIFNa 2a in melanoma patients with regional node metastasis. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 14: A129, 1995.
14. Kirkwood J.M., Ibrahim J., Sondak V., et al. Primary analysis of the E/1690/S9111/C9190 intergroup postoperative adjuvant trial of high and low-dose IFNa2b (HDI and LDI) in high-risk primary or lymph node metastatic melanoma. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 18: A2072, 1999.
15. Pehamberger H., Soyer P., Steiner A., et al. Adjuvant interferon alfa-2a treatment in resected primary stage II cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 16: 1425-1429, 1998.

16. Grob J.J., Dreno B., de la Salmonière P., et al. Randomised trial of inter-feron alfa-2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1,5 mm without clinically detectable node metastases. *Lancet*, 351: 1905-1910, 1998.
17. Nathan F.E., Mastrangelo M.J. Systemic therapy in melanoma. *Semin. Surg. Oncol.*, 14: 319-327, 1998.
18. Balch C.M., Reintgen D.S., Kirkwood J.M., et al. Cutaneous melanoma, in DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds): *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, pp 1979-1989. Philadelphia, PA, Lippincott, 1997.
19. Middleton M.R., Gore M., Tilgen W., et al. A randomised, phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of advanced, meta- static melanoma. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 18: 536a, 1999.
20. Lee S.M., Betticher D.C., Thatcher N. Melanoma: chemotherapy. *Br. Med. Bull.*, 51: 609-630, 1995.
21. Atkins M.B. The treatment of metastatic melanoma with chemotherapy and biologics. *Curr. Opin. Oncol.*, 9: 205-213, 1997.
22. Legha S.S., Ring S., Papadopoulus N., et al. A prospective evaluation of a triple-drug regimen containing cisplatin vinblastine and DTIC (CVD) for metastatic melanoma. *Cancer*, 64: 2024-2028, 1989.
23. Sertoli M.R., Queirolo P., Bajetta E., et al. Multi-institutional phase II ran- domised trial of integrated chemoimmunohormonal therapy with cisplatin, dacarbazine, vindesine, subcutaneous interleukin-2, interferon a2a and ta- moxifen in metastatic melanoma. *Melanoma Res.*, 9: 1-7, 1999.
24. Chapman P.B., Einhorn L.H., Meyers M.L., et al. Phase III multicenter ran- domized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 17: 2745-2751, 1999.
25. Cocconi G., Bella M., Calabresi F., et al. Treatment of metastatic malignant melanoma with dacarbazine plus tamoxifen. *N. Engl. J. Med.*, 327: 516- 523, 1992.
26. Rusthoven J.J., Quirt I.C., Iscoe N.A., et al. Randomized, double-blind pla- cebo controlled trial comparing the response rates of carmustine, dacarba- zine and cisplatin with and without tamoxifen in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 14: 2083-2090, 1996.
27. Falkson C.I., Ibrahim J., Kirkwood J.M., et al. Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon-a 2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon-a 2b and tamoxifen in patients with me- tastatic malignant melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *J. Clin. Oncol.*, 16: 1743-1751, 1998.
28. Creagan E.T., Suman V.J., Dalton R.J., et al. Phase III clinical trial of the combination of cisplatin, dacarbazine, and carmustine with or without ta- moxifen in patients with advanced malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 17: 1884-1890, 1999.
29. Agarwala S.S., Ferri W., Gooding W., et al. A phase III randomized trial da- carbazine and carboplatin with and without tamoxifen in the

- treatment of patients with metastatic melanoma. *Cancer*, 85: 1979-1984, 1999.
30. Rosembreg S.A., Lotze J.C., Topalian S.L. The treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin-2. *JAMA*, 271: 945, 1994.
  31. Rosenberg S.A. Keynote Address: Prospectives on the use of interleukin-2 in cancer treatment. *Cancer J. Sci. Am.*, 3: S2-S6, 1997.
  32. Casamassima A., Guida M., Latorre A., et al. Effects of subcutaneous recombinant IL-2 on humoral immunity in advanced cancer patients. *Int. J. Oncol.*, 3: 171-176, 1993.
  33. Reali U.M., Martini L., Borgognoni L., et al. Infusion of in vitro expanded tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2 in patients with surgically resected lymph node metastasis of malignant melanoma: a pilot study. *Melanoma Res.*, 8: 77-82, 1998.
  34. Ridolfi R., Flamini E., Riccobon A., et al. Adjuvant adoptive immunotherapy with tumor-infiltrating lymphocytes and modulated doses of interleukin-2 in 22 patients with melanoma, colorectal and renal cancer, after radical metastectomy, and in 12 advanced patients. *Cancer. Immunol. Immunother.*, 46: 185-193, 1998.
  35. Queirolo P., Ponte M., Gipponi M., et al. Adoptive immunotherapy with tumor infiltrating lymphocytes and subcutaneous recombinant interleukin-2 plus interferon alfa-2a for melanoma patients with nonresectable distant disease: a phase I/II pilot trial. *Ann. Surg. Oncol.*, 6: 272-278, 1999.
  36. Green R. J., Schuchster L.M. Systemic treatment of metastatic melanoma with chemotherapy. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 12: 863-875, 1998.
  37. Legha S.S., Ring S., Bedikian A., et al. Treatment of metastatic melanoma with combined chemotherapy containing cisplatin, vinblastine and dacarbaine (CVD) and biotherapy using interleukin-2 and interferon- $\alpha$ . *Ann. Oncol.*, 7: 827-835, 1996.
  38. Legha S.S., Ring S., Eton O., et al. Development of a biochemotherapy regimen with the concurrent administration of cisplatin, vinblastine, dacarbaine, interferon alfa and interleukin-2 for patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 16: 1752-1759, 1998.
  39. Guida M., Latorre A., Mastria A., et al. Subcutaneous recombinant interleukin-2 plus chemotherapy with cisplatin and dacarbazine in metastatic melanoma. *Eur. J. Cancer*, 32: 730-733, 1996.
  40. Di Filippo F., Calabro A., Cavaliere R., et al. Prognostic variable in recurrent limb melanoma treated with hyperthermic antitumor perfusion. *Cancer*, 63: 2551-2561, 1989.
  41. Kroon B.B.R. Regional isolation perfusion in melanoma of the limbs; accomplishments, unsolved, problems, future. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 14: 101-110, 1988.
  42. Vaglini M., Ammantuna M., et al. Regional perfusion at high temperature in treatment of stage IIIA-IIIAB melanoma patients. *Tumori*, 69: 585, 1983.

43. Vaglini M., Belli F. et al. Hyperthermic antitumor perfusion with DTIC in stage IIIA-IIIAB melanoma of the extremities. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 13: 127, 1987.
44. Di Filippo F., Anzà M., Rossi C.R., et al. The application of hyperthermia in regional chemotherapy. *Semin. Surg. Oncol.*, 14: 215-223, 1998.
45. Pace M., Galli A., Bellacci A. Local and systemic toxicity in "borderline true" hyperthermic isolated perfusion for lower limb melanoma. *Melanoma Res.*, 5: 371-375, 1995.
46. Pace M., Galli A., Bellacci A. True hyperthermia plus double melphalan bolus in the isolated perfusion for stage III lower limb melanoma. A pilot study. *Reg. Cancer Treat.*, 9: 1-7, 1996.
47. Vaglini M., Belli F., Ammatuna M., et al. Treatment of primary relapsing limb cancer by isolation perfusion with high dose of Tumor Necrosis Factor, Interferon and Melphalan. *Cancer*, 73: 483-491, 1994.
48. Thompson J.F., Liu M., Waugh R. A percutaneous aortic "stop-flow" infusion technique for regional cytotoxic therapy of the abdomen and pelvis. *Reg. Cancer Treat.*, 7: 202, 1994.
49. Thompson J.F., Kam P.C.A., Waugh R.C., Harman C.R. Isolated limb infusion with cytotoxic agents: a simple alternative to isolated limb perfusion. *Semin. Surg. Oncol.*, 14: 238-247, 1998.

## 6. DIRETTIVE FUTURE

Questo capitolo è dedicato a una sintesi delle ricerche in atto o che dovranno essere avviate nei settori di prevenzione e diagnosi, di immunologia e ricerca di base, e, infine, in quello di terapia nelle sue forme più innovative. Vengono in particolare prese in considerazione le aree di ricerca che sembrano al momento offrire maggiori prospettive di possibili applicazioni pratiche nel prossimo futuro.

### PREVENZIONE PRIMARIA E SECONDARIA

È essenziale, per il futuro, controllare che le prime stabilizzazioni dell'incidenza e cali della mortalità per melanoma continuino e quantificare l'eventuale aumento dei melanomi sottili legato a diagnosi precoce e screening. Per la prevenzione primaria, occorre elaborare e verificare messaggi rivolti alla popolazione affinché si esponga prudentemente alla luce del sole, sostituendo l'abbronzatura a tutti i costi con il piacere di stare all'aria aperta evitando i danni del sole. Al momento non esistono evidenze che le creme solari (di qualunque fattore di protezione) abbiano un'efficacia confrontabile alle precauzioni tradizionali (evitare le ore centrali della giornata, ripararsi con cappelli e indumenti, ecc.) nel prevenire l'insorgenza di nevi e melanomi. Ulteriori studi epidemiologici sul ruolo delle creme solari sono, perciò, necessari, come pure sono utili approfondimenti su come l'esposizione solare, il monitoraggio di nevi e gli sforzi di screening debbano variare in base a caratteristiche fenotipiche facilmente riconoscibili dal soggetto e/o dal suo medico.

Sono in corso numerosi studi atti ad individuare caratteristiche associate alla probabilità di mutazioni genetiche (casi multipli nella stessa famiglia, giovane età, melanomi multipli nello stesso individuo, nevi multipli, presenza di alcune definite forme di altri tumori quali carcinoma del pancreas, tumori del SNC ecc.), così come ricerche che individuano specifiche mutazioni geniche nell'ambito di melanomi familiari. Importante oggetto di studio sono inoltre le mutazioni riguardanti p16 e talora p15 (responsabili del controllo della crescita cellulare, dell'omeostasi tissutale e dell'inizio del processo oncogenico) e integrine coinvolte nella progressione tumorale, in particolare la b3 che compare in corrispondenza della trasformazione maligna e nella transizione dalla fase radiale a quella verticale, alterazioni geniche e molecolari coinvolte nell'interazione fra matrice extracellulare e CD44 cellulare, in particolare nel 100% dei melanomi di IV e V livello di Clark (1, 2).

Quando questo tipo di conoscenze consentirà di identificare un rischio attendibile di malattia, potrà essere presa in considerazione un'attività di counseling genetico, che, nel caso del melanoma, a differenza di altri tipi tumorali, potrebbe portare ad una reale e relativamente facile prevenzione e diagnosi precoce. Nel campo della prevenzione secondaria o diagnosi precoce l'ausilio di sistemi computerizzati uniti all'applicativo di tecniche di avanguardia come l'epiluminescenza potranno nettamente migliorare le potenzialità diagnostiche anche nel caso di campagne di indagine di massa.

### TERAPIA ADIUVANTE

I dati recentemente emersi dalla letteratura non consentono a tutt'oggi di esprimere pareri definitivi circa uno standard di terapia adiuvante. Occorrono ulteriori studi per verificare il ruolo dell'Interferone ad alte dosi nelle forme a maggior rischio, così come l'efficacia di altre citochine quali l'IL-2, da sole o in combinazione.

## **IMMUNOBIOLOGIA E IMMUNOTERAPIA**

La maggior parte dei peptidi antigenici identificati nel melanoma umano si associano ad alleli HLA di classe I (alleli ai loci HLA-A, -B e -C) e determinano la formazione di epitopi riconosciuti da linfociti T a fenotipo CD8, in genere a funzione citolitica (3). Dati recentissimi indicano comunque che anche linfociti a fenotipo CD4, di tipo helper, possono riconoscere, in associazione a molecole HLA di classe II (es. alleli ai loci HLA-DR, -DP e -DQ), peptidi derivanti dal processamento e degradazione intracellulari di proteine espresse nel melanoma. Mentre linfociti CD8+ sono considerati effettori finali della risposta immunitaria, i linfociti CD4+ sono determinanti per l'inizio, l'espansione e il mantenimento della risposta immune. È quindi fondamentale che antigeni tumorali riconosciuti da entrambi i principali subsets di linfociti T vengano identificati e utilizzati come bersagli di approcci di immunizzazione. Queste scoperte consentono di ipotizzare nuovi sviluppi terapeutici nel settore dell'immunoterapia antigene-specifica, applicabili ad una frazione cospicua dei pazienti. Questa possibilità teorica deriva sia dalla molteplicità degli antigeni già individuati, sia dal numero di diversi alleli HLA che sono già stati caratterizzati come elementi di restrizione per antigeni tumorali.

Tutti questi approcci terapeutici dipenderanno dalla disponibilità di antigeni tumorali in varia forma. È possibile infatti prevedere l'uso di peptidi sintetici, di geni, di proteine ricombinanti, di lisati di cellule neoplastiche, e di cellule neoplastiche modificate geneticamente per esprimere molecole e fattori immunostimolatori. L'efficacia dei tentativi di potenziare la risposta immunitaria contro antigeni del melanoma non dipenderà solo dalla forma antigenica, ma anche da molti altri fattori. Ad esempio, l'espressione antigenica e di molecole HLA sulle cellule neoplastiche del paziente costituirà un elemento chiave per il riconoscimento immunitario. Inoltre, le modalità di somministrazione del vaccino (dosi, vie di inoculo, uso di adiuvanti, impiego di citochine immuno-regolatorie e di cellule professionali per la presentazione dell'antigene come le cellule dendritiche, etc..) potranno influire in modo determinante sulla capacità effettiva di indurre una risposta immune contro l'antigene oggetto del vaccino. Studi clinici iniziali di vaccinazione (con peptidi sintetici o con lisati di cellule neoplastiche presentati al sistema immunitario da cellule dendritiche) indicano che è possibile attivare in vivo, in pazienti con melanoma metastatico, una risposta immune antigene-specifica contro antigeni del melanoma. A ciò corrisponde anche, in alcuni casi, evidenza di regressione di lesioni neoplastiche preesistenti (4).

Per quanto le conoscenze sulla immunobiologia del melanoma siano grandemente aumentate negli ultimi anni, ed il melanoma cutaneo rappresenti un modello di studio e di applicazione terapeutica "esportabile" ad altre neoplasie solide, ulteriori sforzi conoscitivi saranno indispensabili in ambito pre-clinico e clinico, per sviluppare differenti linee di ricerca che siano però strettamente interconnesse al

fine di ottimizzarne i risultati. Più schematicamente si possono prevedere tre aree di maggiore intervento:

### *1. Immunobiologia*

- a) Meccanismi di elusione della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata
- b) Meccanismi di soppressione della risposta immunitaria umorale e cellulomediata
- c) Potenziamiento della funzione APC delle cellule neoplastiche autologhe

### *2. Bioleggibilità a trattamenti immunologici*

- a) Quantizzazione di precursori linfocitari antigene-specifici circolanti
- b) Analisi del fenotipo antigenico delle lesioni neoplastiche
- c) Costituzione di master bank biologiche

### *3. Bioimmunoterapia*

- a) Produzione ed espansione ex vivo di vaccini cellulari (es. cellule tumorali e/o loro frazioni immunogeniche, cellule immuni con funzione APC), ottenuti anche mediante manipolazione genica
- b) Vaccini proteici o a DNA (es. mAb funzionali mono-bispecifici, peptidi immunogenici naturali e/o ricombinanti, plasmid DNAs, naked DNAs)
- c) Vie e dosi di somministrazione di agenti terapeutici e di adiuvanti immunologici
- d) Analisi ex vivo ed in vivo della risposta immunitaria tumore-specifica indotta dal trattamento

## **VACCINO-TERAPIA E TERAPIA GENICA**

Per vaccinazione intendiamo una tecnica immunoterapica attiva e specifica mediante la quale si possa indurre nell'ospite una risposta immunologica che porti al riconoscimento e alla eliminazione delle cellule tumorali. Gli approcci attraverso i quali è teoricamente possibile ottenere questo risultato sono molteplici.

### ***Vaccinazione con linee cellulari inattivate***

Possono venir utilizzate linee cellulari di melanoma autologhe o allogene irradiate o lisati cellulari mescolati con adiuvanti. Uno studio, descritto da Morton, è stato effettuato utilizzando tre differenti linee cellulari di melanoma, esprimenti almeno sei diversi antigeni noti (5).

### ***Vaccinazione con peptidi associati ad HLA***

Si basa sulla disponibilità di peptidi derivati da antigeni tumorali e sulla conoscenza delle molecole HLA di classe I con cui si associano per costituire il complesso riconosciuto dai linfociti-T. Questo tipo di vaccinazione potrebbe in futuro essere ulteriormente potenziata da tecniche di immunoterapia adottiva, poiché si potrebbe prospettare la possibilità di espandere selettivamente in vitro solo i linfociti con la

specificità voluta. Una limitazione, invece, che questa ipotesi di vaccino comporta è la condizione indispensabile che gli epitopi più rilevanti e la molecola HLA appropriata siano espressi dal tumore che si vuole combattere (6).

#### ***Vaccinazione con ganglioside GM2-KLH-QS21***

I gangliosidi, come altri glicosfingolipidi contenenti acido sialico, sono presenti sulle membrane cellulari di molti tumori. In particolare, il ganglioside GM2 si trova nel 95% delle cellule metastatiche di melanoma, ma solo il 5% dei pazienti sviluppa naturalmente anticorpi contro di esso. Partendo dall'osservazione che comunque i pazienti con anticorpi contro il GM2-ganglioside godono di una prognosi migliore, sono stati sviluppati studi atti ad aumentare enormemente la risposta anticorpale contro di esso. Così l'associazione del ganglioside con una molecola carrier e con una avente funzione adiuvante ha portato alla creazione del complesso GM2-KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)-QS21 (stimulon), che ha permesso di ottenere lo sviluppo di anticorpi nel 100% dei pazienti (7). Attualmente l'EORTC Melanoma Cooperative Group ha organizzato un protocollo di studio di fase III in ambito europeo per verificare l'efficacia di un trattamento basato su questo tipo di vaccinazione con intento adiuvante nello stadio II.

#### ***Vaccinazione con cellule dendritiche (DC)***

Le DC sono le antigen presenting cells (APC) professionali, indispensabili per far scattare il riconoscimento antigenico da parte dei linfociti-T, per attivarne la memoria e l'attività litica. Possono essere coltivate e fatte maturare nell'arco di una settimana, partendo da precursori del midollo osseo o dal sangue periferico, con GM-CSF e IL-4. I potenziali antigeni con cui le DC possono venire pulstate per istruire opportunamente i T-linfociti, sono molteplici. Vi sono al momento numerosissimi trials nel mondo che saggiano questo tipo di vaccinazione, caricando le DC con peptidi noti liberi o associati ad HLA, con pool di peptidi anche non noti, con lisato tumorale, con proteine di derivazione tumorale, con corpi apoptotici, con modificazioni geniche, con frammenti di DNA o RNA tumorale e così via. È importante accertare quale sia la scelta migliore. Una prima segnalazione in letteratura, riguardante questo approccio nel melanoma, è stata eseguita da Nestle, che ha trattato 16 pazienti, riportando 5 risposte cliniche di cui 2 complete (8).

#### ***Vaccinazione con heat shock proteins (HSP)***

Le HSP sono proteine indotte dallo stress in tutti i tipi cellulari, già nelle cellule procarioti. Nelle cellule tumorali esse non differiscono, nella loro struttura base, rispetto a quelle dei tessuti sani dello stesso individuo, tuttavia trascinano fra le loro maglie una grande quantità di peptidi compresi quelli di derivazione tumorale con proprietà antigenica. Nell'animale le HSP estratte da un tumore sono in grado di provocare una risposta immunitaria specifica ed importante con rigetto completo di quella neoplasia. Uno dei vantaggi che potrebbe derivare dal loro uso in clinica è dovuto al fatto che, immunizzando contro un complesso quanto mai vario di peptidi antigenici, dai più importanti a quelli più deboli, esse possono fornire una sorta di

identikit particolarmente accurato della cellula tumorale. In questo caso, dunque, la vaccinazione è personalizzata e viene eseguita per il singolo paziente utilizzando l'estratto proteico del proprio tumore. L'attività delle HSP nell'uomo è, comunque, tuttora da dimostrare ed un aspetto limitante è rappresentato dalla resa in HSP ottenibile dal tumore autologo (9).

### ***Manipolazioni geniche***

Gli approcci relativi alle possibili manipolazioni geniche rappresentano un settore di grande interesse, sia per quanto concerne i possibili vettori, sia per le enormi potenzialità teoriche. L'inserimento di geni nelle cellule tumorali può essere utilizzato per indurre l'espressione di molecole costimolatorie, rendendole così più "visibili" al sistema immunitario, o la secrezione di una determinata citochina ( IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, etc.), in grado di richiamare effettori immunitari e/o di ripristinare le alterazioni locali da immunosoppressione tumorale. Potrebbero essere inseriti geni che correggono difetti genetici o acquisiti, o geni con proprietà oncosoppressive. Ma la manipolazione può riguardare anche altre cellule quali le DC, di cui si è già detto, e gli stessi linfociti, potenziandone le capacità litiche, per esempio facendo loro secernere citochine antitumorali. È evidente che in questo campo della ricerca le teoriche possibilità applicative possono superare, al momento, ogni previsione (10).

## **IMMUNOTERAPIA UMORALE DEL MELANOMA CUTANEO**

Anticorpi monoclonali (mAb) diretti contro antigeni "target" melanoma-associati (Ab1) possono indurre la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC) e/o complemento-dipendente (CDC) delle cellule neoplastiche (immunoterapia passiva). Tuttavia, la ripetuta somministrazione di dosi elevate di mAb eterologhi (anche se umanizzati), genera anticorpi circolanti diretti contro il mAb terapeutico, che possono limitare la prosecuzione e l'efficacia clinica del trattamento. Tali limitazioni sono in parte superate dall'utilizzo clinico di mAb anti-idiotipo (Ab2) di tipo b (i.e., immagine interna dell'antigene riconosciuto dall'Ab1) che sono in grado di indurre in vivo lo sviluppo di anticorpi anti-anti-idiotipo (Ab3), parte dei quali (Ab3 "veri") sono funzionalmente simili allo Ab1 (immunoterapia attiva specifica) (11). Il possibile vantaggio terapeutico degli Ab2 rispetto agli Ab1, deriva dal basso dosaggio di proteina da somministrare, dalla dimostrazione che essi agiscono quale "surrogato" dell'antigene "target" tumore-associato, dal prolungato automantenimento della produzione di Ab3 circolanti, nonché dalla possibilità di attivare una risposta linfocitaria T citotossica (CTL) antigene-specifica. Osservazioni recenti suggeriscono che l'efficacia clinica di mAb terapeutici in grado di indurre la lisi mediata dal complemento omologo delle cellule di melanoma (immunoterapia passiva ed attiva), può essere inficiata dalla presenza della Protectina (CD59) sulle cellule neoplastiche, la cui resistenza alla CDC è inversamente proporzionale al livello di espressione in membrana della Protectina (12). Pertanto, l'analisi quantitativa dell'espressione della Protectina sulle lesioni neoplastiche (vedi Cap. 2, paragrafo "Valutazione della eleggibilità biologica"), può rappresentare un'utile

strategia per selezionare i pazienti che possono trarre maggiore vantaggio terapeutico da trattamenti di immunoterapia umorale.

## **IMMUNOTERAPIA PASSIVA CON MAB AB1**

Il mAb murino R24, diretto contro il disialoganglioside 3 (GD3) espresso ad alta intensità nel melanoma ma non nei tessuti normali, è il mAb terapeutico che ha sinora trovato maggiore applicazione nella clinica del melanoma metastatico. Il potenziale clinico del mAb R24 deriva dalla sua capacità di indurre CDC ed ADCC delle cellule neoplastiche. La somministrazione di dosi intermedie (6-60 mg/m<sup>2</sup>) di mAb R24, utilizzato come singolo agente, ha indotto una risposta clinica nel 10% dei pazienti trattati; peraltro, l'associazione del mAb R24 con agenti farmacologici (dacarbazina, cisplatino, doxorubicina) o biologici (IL-2, GM-CSF, IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , M-CSF), non sembra avere maggiore efficacia clinica rispetto al suo utilizzo come singolo agente (13). Infine, l'associazione del mAb R24 con alte dosi di IL-2 e di ciclofosfamide ha indotto una risposta clinica parziale nel 43% dei soggetti trattati ma in presenza di elevata tossicità sistemica (14).

## **IMMUNOTERAPIA ATTIVA SPECIFICA CON MAB AB2**

### ***Vaccinazione con mAb BEC2***

La somministrazione come singolo agente del mAb murino BEC2, che mima l'antigene GD3, è risultata scarsamente immunogenica nei pazienti trattati; pertanto, è stata successivamente adoperata l'associazione mAb BEC2 con il bacillus-Calmette-Guérin (BCG) come adiuvante. Il trattamento di pazienti affetti da malattia metastatica rimossa chirurgicamente, dimostrava che il 71% dei soggetti che avevano sviluppato Ab3 circolanti diretti contro il GD3 erano vivi e, nel 64% dei casi liberi da malattia, ad un follow-up medio di 2,4 anni (15). In un differente studio clinico, il trattamento con il mAb BEC2, coniugato con la Keyhole Limphet Hemocyanin (KLH) adoperata come carrier, e somministrato in associazione al BCG, ha determinato lo sviluppo di Ab3 circolanti in tutti i pazienti che rispondevano clinicamente; il 78% dei pazienti trattati era vivo a più di due anni dall'inizio della terapia (16).

### ***Vaccinazione con mAb MK2-23***

Il trattamento con il mAb murino MK2-23, che mima l'antigene ad alto peso molecolare associato al melanoma, coniugato con KLH e somministrato (2 mg, s.c.) in associazione al BCG ai giorni 0, 7, 28 e successivamente ad intervalli mensili, ha indotto la formazione di Ab3 circolanti nel 61% dei pazienti affetti da melanoma metastatico vaccinati; questi soggetti hanno avuto una sopravvivenza significativamente maggiore rispetto ai pazienti che non hanno sviluppato Ab3 (17). Inoltre, in selezionati pazienti che hanno ottenuto una risposta clinica completa e di lunga durata, è stata riportata l'insorgenza di vitiligine (18), associata alla presenza di anticorpi circolanti diretti contro melanociti cutanei. In uno studio successivo, la somministrazione del mAb MK2-23 (2 mg, i.d.) ai giorni 0, 7, 28, 56 e quindi con cadenza mensile, associata con dosi

ultrabasse di IL-2 (6x10<sup>5</sup> I.U. s.c., per 5 giorni), induceva una risposta clinica nel 33% dei pazienti affetti da malattia metastatica, ad un anno dall'inizio del trattamento; la contestuale somministrazione di IL-2, in assenza di effetti collaterali immediati o a distanza, riduceva significativamente il tempo necessario allo sviluppo di Ab3 rispetto alla somministrazione del solo mAb MK2-23 (3 mesi vs 10 mesi) (M. Maio et al., comunicazione personale).

#### ***Vaccinazione con MELIMMUNE***

MELIMMUNE è costituito dall'associazione di due mAb murini anti-idiotipo MELIMMUNE-1 e -2, che mimano due differenti epitopi dell'antigene proteoglicano ad alto peso molecolare associato al melanoma. La somministrazione di MELIMMUNE-2, in associazione con il Syntex (SAF-m) come adiuvante, ha indotto una risposta clinica, associata allo sviluppo di Ab3, in 6/26 dei pazienti trattati (19). Nella formulazione terapeutica attualmente adoperata nella clinica (MELIMMUNE), i due mAb sono presenti in diversa quantità ed associati al SAF-m. Quest'ultima formulazione sembra essere efficace nell'indurre anche lo sviluppo di una risposta CTL, osservata nel 43% dei pazienti trattati (20).

## **TERAPIA DELLE FORME AVANZATE**

Le combinazioni chemioterapiche convenzionali offrono percentuali di risposte globali valutabili intorno al 25%. Né l'immunoterapia da sola, con IFN- $\alpha$  e/o IL-2, è stata in grado di fornire risultati migliori. La combinazione chemioimmunoterapica sembra poter offrire percentuali di risposte superiori (fino al 64%), ma sempre in studi di fase II. Sono in corso studi di fase III, con il fine di valutare la reale potenzialità di questo tipo di combinazione (21, 22). Per quanto riguarda i nuovi farmaci che potrebbero a tempi brevi essere impiegati in questa patologia, si segnala la temozolomide, un alchilante con la capacità di superare la barriera ematoencefalica ed utile forse anche contro le metastasi cerebrali. Anche nel campo immunoterapico potrebbero essere impiegati nuovi farmaci, nuove combinazioni di citochine o molecole antisense e proseguire gli studi in corso con impiego di IL-12 per via sistemica, oppure con GM-CSF intrao locoregionale, in aggiunta ad altri farmaci convenzionali. Si segnalano, infine, rinnovati impulsi nello sfruttare i trattamenti locoregionali nel caso di localizzazioni distrettuali. I risultati interessanti segnalati con l'uso locoregionale di carboplatino o fotemustine nelle metastasi epatiche dovranno essere validati.

## BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

1. Monzon J.L., Brill H., et al. CDKN2A mutations in multiple primary melanomas. *N. Engl. J. Med.* 33: 879-887, 1998.
2. Zuo L., Weger J., Yang Q., et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nature Genet.*, 12: 97-99, 1996.
3. Scheibenbogen C., Keilholz U., Mytilineos J., et al. HLA class I alleles and responsiveness of melanoma to immunotherapy with interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) and interleukin-2 (IL-2). *Melanoma Res.*, 4: 191-194, 1994.
4. Greten T.F., Jaffee E.M. Cancer vaccines. *J. Clin. Oncol.*, 17: 1047-1060, 1999.
5. Morton D.L., Foshag L.J., Hoon D.S.B., et al. Prolongation of survival in metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new polyvalent melanoma vaccine. *Ann. Surg.*, 216: 463-482, 1992.
6. Rosenberg S.A., et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with Metastatic Melanoma. *Nature Med.*, 4: 321-327, 1998.
7. Helling F., Zhang S., Shang A., et al. GM2-KLH conjugate vaccine: increased immunogenicity in melanoma patients after administration with immunological adjuvant QS-21. *Cancer Res.*, 55: 2783-2788, 1995.
8. Nestle F.O., Alijagic S., Gillet M., et al. Vaccination of melanoma patients with peptide or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature Med.*, 4: 328-332, 1998.
9. Blachere N.E., Udono H., Janetzki S., Heat Shock Protein vaccines against cancer. *J. Immunother.*, 14: 352-356, 1993.
10. Rosenberg S.A. The immunotherapy and gene therapy of cancer. *J. Clin. Oncol.*, 10: 180-199, 1992.
11. Jerne N.K. Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol.*, 125: 373-389, 1974.
12. Brasoveanu L.I., Altomonte M., Fonsatti E., et al. Levels of cell membrane CD59 regulate the extent of complement-mediated lysis of human melanoma cells. *Lab. Invest.*, 74: 33-42, 1996.
13. Nasi M.L., Meyers M., Livingston P.O., et al. Anti-melanoma effects of R24, a monoclonal antibody against GD3 ganglioside. *Melanoma Res.*, 7: 155-162, 1997.
14. Creekmore S., Urban W., Koop W., et al. Phase IB/II trial of R24 antibody and interleukin-2 (IL2) in melanoma. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 11: 345, 1992.
15. McCaffery M., Yao T.J., Livingston P.O., et al. Immunization of melanoma patients with BEC2 anti-idiotypic monoclonal antibody that mimics GD3 ganglioside: enhanced immunogenicity when combined with adjuvant. *Clin. Cancer Res.*, 2: 679-686, 1996. 97.
16. Yao T.J., Meyers M., Livingston P.O., et al. Immunization of melanoma patients with BEC2-keyhole limpet hemocyanin plus BCG intradermally followed by intravenous booster immunizations with BEC2 to induce anti-GD3 ganglioside antibodies. *Clin. Cancer Res.*, 5: 77-81, 1999.

17. Mittelman A., Chen Z.J. Yang H., et al. Human high molecular weight melanoma-associated antigen (HMW-MAA) mimicry by mouse anti-idiotypic monoclonal antibody MK2-23: induction of humoral anti-HMW-MAA immunity and prolongation of survival in patients with stage IV melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 466-470, 1992.
18. Maio M., Altomonte M., Colizzi F., et al. Induction of a long lasting complete clinical remission associated with vitiligo in a melanoma patient treated with the anti-idiotypic mAb MK2-23. *The New York Academy of Sciences*, II-24, 1993.
19. Quan WD. Jr, Dean GE., Spears L., et al. Active specific immunotherapy of metastatic melanoma with an anti-idiotypic vaccine: a phase I/II trial of I-Mel-2 plus SAF-m. *J. Clin. Oncol.*, 15: 2103-2110, 1997.
20. Pride M.W., Shuey S., Grillo-Lopez A., et al. Enhancement of cell-mediated immunity in melanoma patients immunized with murine anti-idiotypic monoclonal antibodies (MELIMMUNE) that mimic the high molecular weight proteoglycan antigen. *Clin. Cancer. Res.*, 4: 2363-2370, 1998.
21. Legha S.S., Ring S., Eton O., et al. Development of a biochemotherapy regimen with concurrent administration of cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interferon alfa, and interleukin-2 for patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 16: 1752-9, 1998.
22. Rosenberg S.A., Yang J.C., Schwartzentruber D.J., et al. Prospective randomized trial of the treatment of patients with metastatic melanoma using chemotherapy with cisplatin, dacarbazine and tamoxifen alone or in combination with interleukin-2 and interferon alpha 2b. *J. Clin. Oncol.*, 17: 968-975, 1999.