Basi scientifiche per la definizione di ***linee-guida*** in ambito clinico per il **Melanoma cutaneo**

Febbraio 2012

PREFAZIONE

La formulazione di testi sulle Basi Scientifiche Linee Guida per le diverse Patologie Oncologiche è stata avviata da circa 10 anni ed ha portato alla pubblicazione di 16 volumi, per altrettante Patologie Oncologiche, alcuni dei quali già alla seconda o terza riedizione. Avviata a latere degli importanti Progetti Finalizzati di Oncologia del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), è stata successivamente ed è tuttora sponsorizzata e sostenuta da Alleanza Contro il Cancro (ACC).

La distribuzione dei volumi in occasione di Eventi Congressuali e la realizzazione di due siti web, uno CNR ed uno ACC, hanno favorito ed incrementato la diffusione delle informazioni e suscitato un notevole e crescente interesse, come testimoniato dai milioni i accessi registrati ogni anno nei siti *ad hoc*.

Il volume sul Melanoma Cutaneo è stato uno dei primi pubblicati, già nel 2000, e viene attualmente rieditato, su richiesta degli Esperti interdisciplinari operanti nel settore, per un aggiornamento delle conoscenze biologiche acquisite e dell'attuale situazione clinica diagnostica e terapeutica.

Il Melanoma Cutaneo presenta a livello mondiale un'incidenza, sul totale dei tumori, dell'1,5% negli uomini e dell'1,6% nelle donne (Globocan 2008) ed è in continuo aumento, soprattutto nella popolazione di razza bianca.

In Italia, nel periodo 2003-2005, il Melanoma Cutaneo ha rappresentato il 2,1% delle nuove diagnosi di tumore nella popolazione maschile ed il 2,6% in quella femminile e si prevede continuerà ad aumentare nelle prossime due decadi, mentre i tassi di mortalità si sono stabilizzati a partire dagli anni '90 ad indicare, probabilmente, un miglioramento della diagnosi precoce.

L'opera si articola in 14 capitoli e spazia dall'Epidemiologia e Prevenzione primaria, alla Genesi e alle Caratteristiche di familiarità ed immunologiche, alla Diagnosi molecolare e clinica, alla Prevenzione secondaria e Fattori prognostici e predittivi, fino alla descrizione dei vari tipi di Trattamenti chirurgici loco-regionali o sistemici, e alle indicazioni per il *Follow-up*, concludendosi con un capitolo sulle Direzioni future.

Questo testo, analogamente a quelli precedentemente pubblicati relativamente alle altre patologie oncologiche, non vuole sostituire le Linee Guida Cliniche, ma rappresenta un documento aggiornato, propedeutico alla formulazione di queste, allo scopo di renderle più omogenee a livello nazionale, superando l'eterogeneità e gli aspetti a volte contraddittori esistenti tra quelle formulate dalle diverse Regioni e/o Società Scientifiche.

L'estensione del testo è stata affidata a 24 Esperti nazionali delle diverse discipline, componenti del Gruppo di Studio e Collaboratori, e successivamente sottoposto all'esame di un Gruppo di Consenso composto da 21 tra i più qualificati Esperti del settore e rappresentanti di importanti Istituzioni e realtà cliniche.

Ringraziamo tutti i colleghi coinvolti nei Gruppi di Studio e di Consenso, i Collaboratori ed il personale coinvolto nelle Segreterie Scientifiche che con il loro importante contributo hanno permesso la realizzazione di quest'opera.

Carlo Riccardo Rossi
Presidente IMI

Rosella Silvestrini
Coordinatore designato da ACC

Basi scientifiche per la definizione di ***linee-guida***

in ambito clinico per il **Melanoma cutaneo**

Coordinatori	**Carlo Riccardo**	**ROSSI**, Padova
	Rosella	**SILVESTRINI**, Milano
Gruppo di Studio	**Paolo**	**ASCIERTO**, Napoli
	Giovanna	**BIANCHI SCARRA'**, Genova
	Lorenzo	**BORGOGNONI**, Firenze
	Vanna	**CHIARION SILENI**, Padova
	Luigi	**CORTI**, Padova
	Vincenzo	**DE GIORGI**, Firenze
	Riccardo	**DE GOBBI**, Padova
	Franco	**DI FILIPPO**, Roma
	Michele	**MAIO**, Siena
	Daniela	**MASSI**, Firenze
	Simone	**MOCELLIN**, Padova
	Marcella	**MOTTOLESE**, Roma
	Nicola	**MOZZILLO**, Napoli
	Giuseppe	**PALMIERI**, Sassari
	Paola	**QUEIROLO**, Genova
	Licia	**RIVOLTINI**, Milano
	Carlo Riccardo	**ROSSI**, Padova
	Mauro	**SCHIAVON**, Udine
	Ignazio	**STANGANELLI**, Meldola (FC) e Milano
	Renato	**TALAMINI**, Aviano
	Alessandro	**TESTORI**, Milano

Hanno inoltre collaborato all'elaborazione del documento i dottori: Corrado **Caracò** (NA), Sandro **Pasquali** (PD), Paolo **Visca** (Roma).

Gruppo di Consenso	**Emilio**	**BAJETTA**, Milano
	Maria Grazia	**BERNENGO**, Torino
	Riccardo	**BONO**, Roma
	Gerardo	**BOTTI**, Napoli
	Natale	**CASCINELLI**, Milano
	Cateriana	**CATRICALA'**, Roma
	Alessandra	**CHIARUGI**, Firenze
	Claudio	**CLEMENTE**, Milano
	Emanuele	**CROCETTI**, Firenze
	Maria Concetta	**FARGNOLI**, L'Aquila
	Virginia	**FERRARESI**, Roma
	Sara	**GANDINI**, Milano
	Paola	**GHIORZO**, Genova
	Michele	**GUIDA**, Bari
	Pier Giorgio	**NATALI**, Roma
	Giorgio	**PARMIANI**, Milano
	Maria Antonietta	**PIZZICHETTA**, Aviano
	Ruggero	**RIDOLFI**, Forlì
	Mario	**SANTINAMI**, Milano
	Paola	**ZANOVELLO**, Padova

Si ringraziano le dott.sse Paola **Persici** e Francesca **Mazzetti**, la dott.ssa Marta **Rotella** e la sig.ra Luciana **Rainaldi** della Segreteria Scientifica per l'importante contributo scientifico, editoriale ed organizzativo.

Questo testo sarà accessibile nel sito **www.alleanzacontroilcancro.it**, sezione "Formazione".

INDICE

1.0	**Epidemiologia e prevenzione primaria**	**11**
1.1	Incidenza, prevalenza, sopravvivenza e mortalità	11
1.2	Fattori di rischio	12
1.3	Prevenzione primaria	25
2.0	**Genesi**	**32**
2.1	Vie genetico-molecolari coinvolte nella patogenesi del melanoma	33
2.2	Modello di sviluppo e progressione del melanoma	39
2.3	Classificazione molecolare	42
3.0	**Melanoma familiare**	**51**
3.1	Modello generale di suscettibilità	52
3.2	Consulenza e test genetico	55
3.3	Prospettive future	62
4.0	**Immunologia**	**68**
4.1	Caratteristiche di immunogenicità del melanoma cutaneo	68
4.2	Meccanismi di priming della risposta immunitaria anti-melanoma e ruolo delle cellule dendritiche	70
4.3	Repertorio antigenico delle cellule di melanoma	71
4.4	Meccanismi di tumor immune escape nel melanoma: ruolo delle cellule tumorali	74
4.5	Meccanismi di regolazione immunitaria negativa	77
4.6	Signature immunologica del melanoma	83
5.0	**Diagnosi**	**88**
5.1	Diagnosi clinica	88
5.2	Forme speciali	90
5.3	Diagnosi dermoscopica	95

5.4 Monitoraggio digitale 99
5.5 Fotografia dell'intera superficie cutanea 101
5.6 Innovazione e sviluppo tecnologico 101

6.0 Prevenzione secondaria 108
6.1 Valore dell'esame clinico generale 108
6.2 Identificazione di un sospetto melanoma 109
6.3 Importanza dell'autoesame 111
6.4 Ruolo del Medico di Medicina Generale 112
6.5 Ruolo centrale del dermatologo nella diagnosi precoce 114
6.6 Impatto degli screening nella prevenzione secondaria 114
6.7 Campagne di educazione sanitaria 115
6.8 Informazione via Internet 116
6.9 Monitoraggio dei pazienti a rischio 117

7.0 Diagnosi istopatologica e molecolare 124
7.1 Classificazione clinico-patologica di Clark 126
7.2 Caratteristiche clinico-patologiche 127
7.3 Classificazione molecolare 135
7.4 Confronto tra istotipi tradizionali e classificazione molecolare 137
7.5 Classificazione molecolare e trattamento del melanoma metastatico 138

8.0 Stadiazione 143

9.0 Fattori prognostici e predittivi di risposta clinica 156
9.1 Marcatori prognostici istopatologici 157
9.2 Marcatori prognostici bio-molecolari 160
9.3 Marcatori sierici 163
9.4 Fattori predittivi di risposta a terapia 164

10.0 Trattamento chirurgico e loco-regionale 169
10.1 Biopsia e trattamento del primitivo 169
10.2 Linfonodi 173
10.3 Metastasi in transito 178
10.4 Metastasi a distanza 188

11.0 Trattamento medico 194
11.1 Chemioterapia 194
11.2 Immunoterapia 206
11.3 Vaccinoterapia 214
11.4 Target Therapy 220

12.0 Trattamento radiante 232
12.1 Radioterapia 232
12.2 Ipertermia nel trattamento del melanoma cutaneo 238

13.0 Follow-up 245
13.1 Programmi di follow-up 246
13.2 Aspetti controversi 248

14.0 Direttive future 256

Acronimi 263

1.0 EPIDEMIOLOGIA E PREVENZIONE PRIMARIA

1.1 Incidenza, prevalenza, sopravvivenza e mortalità
1.2 Fattori di rischio
1.3 Prevenzione primaria

1.1 Incidenza, prevalenza, sopravvivenza e mortalità

Nel mondo, il melanoma cutaneo è al 16° posto tra i tumori più frequenti negli uomini ed al 17° posto nelle donne (2008). Rappresenta per incidenza l'1,5% del totale dei tumori negli uomini e l'1,6% nelle donne, con circa 102.000 nuovi casi/anno (26.000 morti/anno) e 98.000 nuovi casi/anno (21.000 morti/anno), rispettivamente negli uomini e nelle donne (1).
Negli ultimi 40 anni, l'incidenza del melanoma è aumentata, soprattutto tra la popolazione di razza bianca. Negli Stati Uniti, l'incidenza del melanoma è passata da 6 casi per 100.000 abitanti all'inizio del 1970 a 18 casi per 100.000 abitanti all'inizio del 2000, mostrando un incremento del tasso di incidenza di 3 volte. Nello stesso periodo, nei Paesi dell'Europa centrale, i tassi di incidenza sono passati da 3-4 casi per 100.000 a 10-15 casi per 100.000 abitanti, mostrando incrementi analoghi agli Stati Uniti (2). Inoltre, lo studio dei *trend* d'incidenza indica che nei Paesi occidentali i tassi continueranno ad aumentare anche nelle prossime due decadi. Viceversa, i tassi di mortalità si sono stabilizzati in alcuni Paesi, a partire dagli anni '90, indicando, probabilmente, un miglioramento nella diagnosi precoce (2).
Per quanto riguarda la sopravvivenza, un recente lavoro, che ha utilizzato i dati dei Registri Tumori di 18 Paesi europei (EUROCARE-4) relativi al periodo dal 1988 al 1999, ha evidenziato che la sopravvivenza a 5 anni del melanoma è aumentata, passando dal 78% all'83% (3).
In Italia, si stimano per il 2011 quasi 13.000 nuove diagnosi di melanoma (4). Nonostante il melanoma rappresenti il 2-3% del totale dei tumori (esclusa cute non melanoma), risulta ai primi posti in termini di frequenza nei soggetti di età < 50 anni, tra i quali rappresenta l'8-10% del totale in entrambi i sessi (4).
Il numero medio annuo di casi di melanoma registrati nell'area coperta dai Registri Tumori è stato di 14,3 casi per 100.000 uomini e di 13,6 per 100.000 donne. L'analisi dei *trend* di incidenza, espressi

come stima annuale del cambiamento percentuale del tasso standardizzato APC (*Annual Percentage Change*), ha mostrato un significativo aumento negli uomini (APC: + 3,8) e nelle donne (APC: + 1,9). Tra gli uomini, anche la mortalità è in significativa crescita (APC: + 2,6).
La mortalità per melanoma tra gli uomini è l'unica in aumento assieme a quella per il polmone tra le donne (3). L'incidenza è simile fra Nord e Centro ed inferiore nel Meridione, mentre la mortalità appare più omogenea (5).
Al 1 gennaio 2006, l'analisi dei dati di prevalenza ha mostrato che c'erano circa 81.000 persone viventi (34.000 uomini e 47.000 donne) che avevano avuto una diagnosi di melanoma nel corso della loro vita. Di queste, circa il 40% ha avuto una diagnosi di melanoma negli ultimi 5 anni rispetto al gennaio 2006 (6).
Recenti dati di sopravvivenza (7) mostrano una sopravvivenza relativa a 5 anni dalla diagnosi del 81% negli uomini e del 88% nelle donne, con un gradiente alla riduzione sia all'aumentare dell'età sia geografico, da Nord a Sud Italia (7)

1.2 Fattori di rischio

Esposizione al sole e scottature
Fin dagli anni '80, l'esposizione al sole è stata identificata in molti studi epidemiologici come la principale causa ambientale di melanoma, nonostante questa relazione sia tuttora dibattuta (8,9).
In particolare, è stata riportata un'associazione positiva diretta con l'esposizione intermittente al sole durante il tempo libero (10,11).
L'accumulo di evidenze scientifiche ha portato nel 1991 ad una prima *Consensus conference* sui danni da radiazioni solari (12), nella quale i componenti della Commissione hanno concordato che l'esposizione alla luce solare è il solo fattore esogeno causale per il melanoma nelle popolazioni di razza bianca. L'anno successivo, 1992, un altro gruppo di ricercatori, riunitosi presso l'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) di Lione (13), dopo aver rivisto con grande dettaglio i lavori scientifici pubblicati sull'associazione tra melanoma ed esposizione al sole, ha concluso che l'esposizione solare è la principale causa del melanoma nell'uomo. D'interesse, il ruolo della luce UV (*Ultraviolet)* come fattore induttore nella genesi

del melanoma in età infantile, che è stato convalidato anche in un modello murino (14).
Sono stati pubblicati 2 studi di meta-analisi (15,16) ed uno studio di *pool* analisi (17) sull'argomento.
Lo studio di Gandini et al. (15) ha analizzato i risultati di 57 lavori internazionali pubblicati nel periodo 1969-2002 (50 studi caso-controllo, 5 studi di coorte e 2 *nested* caso-controllo). Gli Autori hanno calcolato un rischio relativo *pool* (RR) per il melanoma di 1,34 (95% intervallo di confidenza - CI: 1,02-1,77) nei soggetti esposti a radiazioni UV rispetto ai non-esposti.
Inoltre, gli Autori hanno identificato l'esposizione solare: intermittente (i.e., solo come attività sportive all'aria aperta, sport acquatici e vacanze in posti soleggiati), continua (i.e., solo esposizione occupazionale) e totale (i.e., sia intermittente sia continua).
Questo rischio, in confronto ai non-esposti, era significativamente più elevato nei soggetti con un'esposizione intermittente (RR=1,61; 95% CI: 1,31-1,99) rispetto ai soggetti con un'esposizione continua (RR=0,98).
I soggetti con una storia di scottature avevano un rischio di circa 2 volte più elevato (RR=2,03; 95% CI: 1,73-2,37) rispetto a quelli con una storia negativa. Inoltre, il rischio era più elevato quando gli episodi di scottature erano avvenuti nell'infanzia rispetto all'età adulta (15).
Lo studio di Dennis et al. (16) ha analizzato 51 lavori internazionali, pubblicati nel periodo 1985-2002, valutando il rischio di melanoma rispetto alla storia di scottature ed all'esposizione solare durante tutta la vita dei soggetti. Gli Autori hanno trovato che il rischio di melanoma per le scottature in specifici periodi della vita era leggermente più elevato se queste erano avvenute nell'infanzia (OR: 1,9; 95% CI: 1,6-2,3) e nell'adolescenza (OR=1,6; 95% CI: 1,4-1,9) rispetto all'età adulta (OR=1,4; 95% CI: 1,3-1,6).
Il rischio calcolato su tutto il periodo della vita era 1,6 (95% CI: 1,4-1,8), rischio che è coerente con quelli osservati nei singoli periodi della vita. In 26 lavori, tra quelli identificati, è stato possibile calcolare il rischio di melanoma per il numero di scottature (clinicamente rilevanti), avvenute nel corso della vita dei soggetti.
Gli Autori hanno calcolato che per incrementi di 5 scottature avvenute nei vari periodi della vita, i rischi erano 1,4 nell'infanzia, 1,4 nell'adolescenza e 1,5 nell'età adulta, confermando che sia

la scottatura in sé sia il numero di scottature avvenute nel corso della vita rappresentano un importante fattore di rischio per il melanoma.
Lo studio di Chang et al. (17) ha analizzato l'associazione tra rischio di melanoma ed esposizione solare a diverse latitudini, durante il tempo libero e durante il lavoro. La *pool* analisi è stata fatta considerando 15 studi caso-controllo pubblicati nel periodo 1994-2006 (5.700 casi di melanoma e 7.216 controlli). Gli Autori hanno evidenziato che l'esposizione durante il tempo libero, stratificata per latitudine di residenza dei soggetti, era un fattore di rischio di melanoma per il tronco (OR=1,7; 95% CI: 1,4-2,2) e per gli arti (OR=1,4; 95% CI: 1,1-1,7), ma non per il capo-collo (OR=1,1; 95% CI: 0,8-1,4).
L'esposizione solare durante il lavoro era associata con il rischio di melanoma per il capo-collo nelle aree a bassa latitudine (OR=1,7; 95% CI: 1,0-3,0).
Il rischio associato alle scottature nell'infanzia era 1,5 (95% CI: 1,3-1,7), 1,5 (95% CI: 1,3-1,7) e 1,4 (95% CI: 1,1-1,7), rispettivamente per il melanoma del tronco, degli arti e del capo-collo, mostrando solo piccole differenze per le diverse latitudini. Lo studio ha evidenziato che il rischio di melanoma in differenti parti del corpo è associato con differenti modelli di esposizione. L'esposizione solare durante il tempo libero è un forte indicatore di rischio di melanoma a tutte le latitudini, mentre l'esposizione durante il lavoro e l'esposizione totale appaiono indicatori di rischio di melanoma, soprattutto a basse latitudini.
In conclusione, i risultati della letteratura mostrano che vi è una associazione positiva tra esposizione ai raggi solari e rischio di melanoma e che il rischio è elevato a tutte le età. Inoltre, il rischio aumenta con il numero di scottature avvenute nel corso della vita.

Nevo comune e nevo atipico

I risultati della letteratura scientifica hanno suggerito che, per le popolazioni di origine Caucasica, il numero di nevi melanocitari rappresenta un valido indicatore di rischio per il melanoma e che i nevi atipici possono avere un ruolo indipendente (18,19).
Inoltre, il rischio di melanoma è basso nei soggetti con pochi nevi comuni, mentre è più elevato nei soggetti con nevi multipli e nevi atipici (20).
Recentemente, sono stati pubblicati 2 lavori di meta-analisi (21,22). Lo studio di Gandini et al. (21) ha analizzato i risultati di 46 lavori

internazionali pubblicati nel periodo 1969-2002 (36 studi caso-controllo, 8 studi di coorte e 2 studi *nested*). Gli Autori hanno confermato che il numero di nevi comuni è un importante fattore di rischio, con un incremento di rischio associato alla presenza di un numero > 100 nevi in confronto ad un numero < 15 nevi (RR=6,89; 95% CI: 4,63-10,25) e al numero di nevi atipici (RR=6,36; 95% CI: 3,80-10,33 per ≥ 5 verso zero).
Lo studio di Olsen et al. (22), in particolare, ha analizzato l'associazione tra rischio di melanoma e tipo di nevi, calcolando la frazione di rischio attribuibile (PAF, *Population Attributable Fraction*), cioè la proporzione di casi di melanoma nella popolazione attribuibile alla presenza dei singoli fattori di rischio.
In questa meta-analisi sono stati valutati 49 studi, pubblicati nel periodo 1980-2008, di cui 25 sui nevi atipici e 23 sui nevi comuni. Gli Autori hanno trovato che per i soggetti con ≥ 1 nevo atipico il rischio relativo di melanoma era 3,63 (95% CI: 2,85-4,62), con un PAF del 25% ed inoltre, che il 4%, il 7%, il 15% ed il 25% dei melanomi era attribuibile (PAF) ai soggetti con un numero di nevi comuni rispettivamente ≤ 10, 11-24, 25-49 e ≥ 50.
In conclusione, i risultati della letteratura mostrano che il numero dei nevi comuni, dei nevi atipici e dei nevi multipli è un importante fattore di rischio per il melanoma. E' opportuno sottolineare che il termine di nevo atipico è considerato un sinonimo di nevo *clinicamente* displastico e che non esiste una correlazione stringente tra nevo *clinicamente* displastico e nevo *istologicamente* displastico (displasia dimostrata all'esame istopatologico). I principali criteri cito-architetturali che consentono di porre diagnosi di nevo istologicamente displastico sono: estensione laterale della componente giunzionale oltre la componente dermica (estesione laterale o "spalla"), nidi di melanociti giunzionali irregolarmente orientati (proliferazione a nidi disordinati), iperplasia epidermica lentigginosa, atipia citologica discontinua (*random*), fibroplasia ed infiltrato linfocitaria dermico.
Ad oggi, non è dimostrato che il nevo displastico istologicamente determinato rappresenti un precursore morfologico del melanoma.

Storia familiare per melanoma
Negli ultimi 20 anni, sono stati pubblicati molti studi epidemiologici che hanno valutato il rischio di melanoma con la storia familiare di melanoma, riportando un aumento di rischio compreso tra 1,5 e 5,0.

Recentemente, sono stati pubblicati 2 studi di meta-analisi (23,24), che hanno confermato questi risultati.
Nella meta-analisi di Peto e Houlston (2001) (23) si è confermata un'associazione positiva tra rischio di melanoma e familiarità per melanoma (RR=2,5). A simile conclusione è giunta la successiva meta-analisi di Gandini et al. (24), in cui gli Autori hanno analizzato i risultati di 60 lavori internazionali pubblicati nel periodo 1969-2002 (57 studi caso-controllo, 2 studi di coorte ed 1 studio *nested*): gli Autori hanno confermato che i soggetti con familiarità positiva per melanoma hanno un rischio *pool* di melanoma di 1,74 (95% CI: 1,41-2,14) in confronto a quelli senza familiarità.
In conclusione, i risultati della letteratura hanno evidenziato come i soggetti con una storia familiare positiva per melanoma hanno un rischio di circa 2 volte più elevato di sviluppare un melanoma rispetto a soggetti senza familiarità.

Caratteristiche fenotipiche
Tra gli studi epidemiologici pubblicati (1984-2004), molti hanno valutato l'associazione tra rischio di melanoma e caratteristiche fenotipiche della popolazione (ad esempio, densità delle lentiggini, colore degli occhi, dei capelli e della pelle). La maggior parte di questi studi ha mostrato un rischio elevato di melanoma nei soggetti con alta densità di lentiggini (rischi tra 1,7 e 6,9) verso bassa densità; occhi chiari/grigi (rischi tra 1,1 e 3,8) e occhi blu (rischi tra 1,0 e 4,5) verso occhi neri; capelli rossi (rischi tra 1,2 e 7,8) e biondi (rischi tra 1,1 e 4,9) verso capelli neri; pelle chiara (rischi tra 1,6 e 9,0) verso pelle scura/olivastra. La variabilità del rischio di melanoma, e soprattutto alcuni risultati discordanti, sono probabilmente dovuti ad un aggiustamento non appropriato dei rischi per tutti quei fattori di confondimento noti (ad esempio, razza, durata esposizione solare, varie caratteristiche fenotipiche, foto-tipo e familiarità per melanoma).
Recentemente, sono stati pubblicati 2 studi di meta-analisi (24,25). Lo studio di Gandini et al. (24) ha analizzato i dati di 60 lavori internazionali pubblicati nel periodo 1969-2002.
Gli Autori hanno evidenziato che i soggetti con un'alta densità di lentiggini hanno un rischio di melanoma 2 volte più grande in confronto a quelli senza lentiggini o con lentiggini diradate (RR=2,10; 95% CI: 1,80-2,45).
I soggetti con foto-tipo di Fitzpatrick I verso quelli con foto-tipo IV hanno un rischio di melanoma di 2.0 (Tabella 1).

I soggetti con occhi chiari hanno un rischio di melanoma più grande rispetto a quelli con occhi neri (RR=1,62; 95% CI: 1,44-1,81). In confronto ai soggetti con capelli neri, il rischio di melanoma era più elevato nei soggetti con capelli rossi (RR=3,64), intermedio nei soggetti con capelli biondi (RR=1,61) e basso nei soggetti con capelli castani (RR=1,52). Infine, il rischio di melanoma nei soggetti con pelle chiara era maggiore in confronto a quelli con pelle scura/olivastra (RR=2,06; 95% CI: 1,68-2,52).
La meta-analisi di Olsen et al. (25) ha analizzato i dati di 66 lavori internazionali pubblicati nel periodo 1979-2008 (42 studi caso-controllo ospedalieri; 20 studi caso-controllo di popolazione, 3 studi di coorte e 1 studio *nested*). Gli Autori hanno calcolato che i rischi *pool* erano: 2,64 per soggetti con capelli rossi/rosso-biondi, 2,0 per quelli biondi e 1,46 per quelli castano chiaro verso i soggetti con capelli neri. I rischi erano: 1,57 per i soggetti con occhi blu/blu-grigi, 1,51 per quelli con occhi verdi/grigi/nocciola verso quelli con occhi neri.
I rischi erano: 2,27, 1,99 e 1,35 per i soggetti con foto-tipo della pelle I, II e III rispettivamente verso quelli con foto-tipo IV.
Infine, il rischio di melanoma era 1,99 per i soggetti con lentiggini verso quelli senza lentiggini. Inoltre, gli Autori hanno calcolato che il valore di PAF era del 27% per il foto-tipo I/II, del 23% per la presenza di lentiggini, del 23% per il colore chiaro/biondo dei capelli e del 18% e del 13% per gli occhi blu/blu-grigi e verdi/grigi/nocciola, rispettivamente.
In conclusione, ci sono ragionevoli evidenze scientifiche che i soggetti con pelle, occhi e capelli chiari e con foto-tipo I/II hanno un rischio di melanoma doppio rispetto ai soggetti con pelle scura/olivastra e con occhi, capelli scuri/neri e foto-tipo IV.
Sebbene lo *screening* di massa rappresenti il migliore presidio di prevenzione secondaria dei tumori, esso non è proponibile per gli alti costi riferibili alla necessità, da parte di specialisti dermatologi, di esaminare l'intero ambito cutaneo di tutti i soggetti di età superiore ai 16-18 anni. Più proponibile è uno *screening* selettivo diretto ai soggetti ad alto rischio (ad esempio, familiarità per melanoma, caratteristiche fenotipiche e portatori di lesioni pigmentate) (26,27).

Tabella 1 Suscettibilità alle scottature: foto-tipi secondo Fitzpatrick

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 o castano-chiari, occhi chiari, carnagione chiara, spesso con efelidi, sensibile; reagisce quasi sempre a forti esposizioni e si abbronza leggermente.
3	Capelli castani, occhi chiari o scuri, carnagione bruno-chiara; reagisce a volte ai colpi di sole, abbronzatura pronunciata.
4	Capelli castano-scuri o neri, occhi scuri, carnagione da olivastra a scura, 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 di razza nera.

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

E' noto come l'esposizione intensa ed intermittente alle radiazioni UV solari sia un importante fattore di rischio per il melanoma (15).

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

Prima del 1992, le radiazioni UVB erano considerate la sola parte cancerogena dello spettro solare, ma da allora anche le radiazioni UVA sono state sospettate di essere un potenziale cancerogeno. Per questo, nel 1992, la IARC ha classificato le radiazioni UVB e UVA, e "l'uso di lampade e lettini per l'abbronzatura" come "probabili cancerogeni per l'uomo" (Gruppo 2A, della Classificazione IARC degli agenti cancerogeni) (13).

Molti studi epidemiologici hanno esaminato l'associazione tra rischio di melanoma e l'uso di lampade e/o lettini per l'abbronzatura.

Questo perché l'utilizzo di queste apparecchiature, che si è andato diffondendo dagli anni '80 in molti Paesi sviluppati, in particolare del Nord Europa e degli Stati Uniti, è una fonte artificiale di radiazioni UV.
Recentemente, sono stati pubblicati 2 studi di meta-analisi (28,29) ed uno studio caso-controllo di popolazione (30), che hanno analizzato l'associazione tra rischio di melanoma e l'utilizzo di lampade e/o lettini per l'abbronzatura.
Nello studio di Gallagher et al. (28), gli Autori hanno analizzato i risultati di 10 lavori internazionali pubblicati nel periodo 1984-2004 (9 studi caso-controllo e 1 studio di coorte). Gli Autori hanno calcolato un rischio relativo *pool* per il melanoma di 1,25 (95% CI: 1,05-1,49) nei soggetti che avevano fatto uso nella loro vita di lampade e/o lettini per l'abbronzatura rispetto a quelli che non ne avevano fatto uso. Inoltre, il rischio di melanoma era maggiore nei soggetti che si erano esposti per la prima volta in giovane età < 40 anni (RR=1,69; 95% CI: 1,32-2,19) e nei soggetti che avevano usato queste apparecchiature molto di frequente o per lunghi periodi (RR=1,61; CI: 1,21-2,12).
Nella successiva meta-analisi della IARC (2007) (29), sono stati analizzati i risultati di 23 lavori internazionali pubblicati nel periodo 1981-2005 (11 studi caso-controllo di popolazione e 12 studi caso-controllo).
Gli Autori hanno calcolato un rischio relativo *pool* (basato su 19 studi) per il melanoma di 1,15 (95% CI: 1,00-1,31) nei soggetti che avevano fatto uso di lampade e/o lettini per l'abbronzatura rispetto a quelli che non ne avevano fatto uso. Tuttavia, non vi era nessuna relazione con la dose dell'esposizione. Inoltre, il rischio di melanoma era maggiore nei soggetti che si erano esposti per la prima volta in giovane età < 35 anni (RR=1,75; 95% CI: 1,35-2,26).
Nel 2010, è stato pubblicato uno studio caso-controllo di popolazione (1.167 casi e 1.101 controlli) condotto nel periodo 2004-2007 nello stato del Minnesota (30).
Gli Autori hanno analizzato l'uso, a casa, di lampade per l'abbronzatura, raccogliendo informazioni dettagliate circa le caratteristiche delle lampade usate (per esempio modello, emissioni di UVA e UVB). Gli Autori hanno trovato un aumento di rischio per melanoma nei soggetti che avevano fatto uso di lampade e/o lettini per l'abbronzatura (OR=1,74; 95% CI: 1,42-2,14) rispetto a chi non ne aveva fatto uso.
Inoltre, è risultato che il rischio di melanoma era medio nei soggetti che avevano utilizzato apparecchi che intensificavano le radiazioni

UVB (OR=2,86; CI: 2,03-4,03), più elevato, invece, nei soggetti che avevano utilizzato apparecchi che emettevano radiazioni UVA (OR=4,44; 95% CI: 2,45-8,02) ed infine, che il rischio aumentava con gli anni e le sedute di esposizione.
In conclusione, i risultati della letteratura scientifica indicano che vi è un significativo aumento del rischio di melanoma nei soggetti che fanno uso di lampade e/o lettini per l'abbronzatura e che il rischio è maggiore se l'esposizione avviene in giovane età. Inoltre, i dati sono di supporto alle indicazioni della IARC ossia che l'abbronzatura ottenuta con lampade e/o lettini per l'abbronzatura è cancerogena per l'uomo e dovrebbe essere evitata per ridurre il rischio di melanoma (31).
In Italia, è stato promulgato un decreto del Ministero dello Sviluppo Economico (n.110 del 12 maggio 2011), con il quale sono state normate le apparecchiature di tipo estetico, e tra queste anche quelle abbronzanti, in cui si esplicita il divieto d'uso di queste apparecchiature per i minori di 18 anni, le donne in gravidanza, soggetti che soffrono o hanno sofferto di tumore della cute e quelli che si abbronzano con difficoltà o che si scottato con facilità.

Uso di creme solari protettive

Le creme solari protettive sono state pensate per proteggere la pelle dagli effetti dannosi dei raggi solari. Alcuni studi suggerivano che la limitazione dell'esposizione alle radiazioni UV utilizzando le creme solari protettive potesse ridurre il rischio dei tumori della pelle non-melanomi fino al 78%. Viceversa, altri studi hanno suggerito che le creme solari protettive non proteggono dal rischio di melanoma. Tuttavia, la sensibilità individuale al sole aveva probabilmente prodotto delle associazioni fuorvianti tra l'uso delle creme solari protettive ed il rischio di melanoma. Infatti, pochi studi avevano stratificato i soggetti secondo la loro sensibilità al sole o condotto controlli appropriati per aggiustare questo fattore. Le persone sensibili alle radiazioni solari sono notoriamente a più alto rischio di melanoma e sono quelle più portate all'utilizzo di creme solari protettive (32,33). Di conseguenza, il rischio aumentato di melanoma tra gli utilizzatori di creme solari potrebbe essere causato dalla sensibilità al sole dei soggetti, piuttosto che unicamente all'uso di creme solari protettive, o anche dalla falsa sicurezza che può indurre gli utilizzatori ad esporsi per periodi più lunghi di quelli indicati dalle industrie produttrici di creme solari e dalla non consapevolezza che le applicazioni delle stesse devono essere ripetute nel coso della giornata (31).

Quindi un mancato controllo degli effetti confondenti della sensibilità al sole produrrebbe rischi più grandi di quelli aggiustati per la sensibilità al sole.
Recentemente, sono stati pubblicati 2 studi di meta-analisi (34,35) che hanno analizzato l'associazione tra rischio di melanoma ed uso di creme solari protettive.
Nello studio di Huncharek et al. (34), gli Autori hanno analizzato i dati di 11 studi caso-controllo. Gli Autori hanno calcolato un rischio per il melanoma di 1,01 (95% CI: 0,46-2,28) nei soggetti che avevano fatto uso di creme solari protettive rispetto a quelli che non avevano fatto uso, indicando che non vi era nessuna associazione tra creme solari protettive e rischio di melanoma.
In seguito, è stata pubblicata un'esaustiva meta-analisi di 18 studi caso-controllo pubblicati tra il 1966 e il 2003. Dennis et al. (35) hanno calcolato un rischio *pool* per l'uso continuo di creme solari protettive uguale a 1,0 (95% CI: 0,8-1,2). Inoltre, hanno osservato che tra gli studi c'era una certa eterogeneità, per questo hanno condotto un'ulteriore analisi per cercare di spiegare le cause di questa eterogeneità, includendo la sensibilità al sole e la durata dell'esposizione, due variabili che sono considerate potenziali fattori di confondimento. Dopo l'aggiustamento, il rischio *pool* calcolato scendeva a OR=0,8 (95% CI: 0,6-1,0) e diminuiva ulteriormente aggiustando anche per la dose: OR=0,76 (95% CI: 0,65-0,90). Quindi, gli Autori hanno concluso che l'uso di creme solari protettive riduce il rischio di melanoma.
In conclusione, clinicamente l'uso delle creme solari protettive ad elevato potere schermante e, comunque, adatte al proprio foto-tipo può ridurre il rischio di melanoma prevenendo le scottature; ciò nondimeno, le persone devono sapere che le creme solari protettive proteggono la pelle per periodi limitati di esposizione al sole e che le applicazioni delle stesse devono essere ripetute.
Per questo, i consumatori dovrebbero essere informati sui potenziali rischi alla salute associati con l'utilizzo di creme solari protettive durante l'esposizione intenzionale (36).
Inoltre, le industrie di cosmetici dovrebbero riportare sulle confezioni delle creme solari protettive le attuali informazioni scientifiche sui potenziali rischi alla pelle e, soprattutto, che una prolungata esposizione al sole può causare una scottatura ed aumentare il rischio di melanoma.

Uso di contraccettivi orali

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

Tra gli studi pubblicati spiccano due lavori, uno studio di meta-analisi del 1997 (37) ed uno studio successivo di *pool* analisi del 2002 (38); entrambi hanno cercato di valutare attentamente questa associazione, tenendo conto di tutte quelle variabili di confondimento, che sono spesso responsabili della variabilità della misura del rischio.

Nella meta-analisi di Pfahlberg et al. (37), gli Autori hanno analizzato i dati di 18 studi caso-controllo pubblicati nel periodo 1977-1999. Il rischio *pool* calcolato era di 0,95 (95% CI: 0,87-1,04) per le donne che avevano fatto uso di contraccettivi orali rispetto a quelle che non ne avevano fatto uso.

Nella *pool* analisi di Karagas et al. (38), gli Autori hanno acquisito ed analizzato i dati originali di 10 studi caso-controllo per un totale di 2.391 casi e 3.199 controlli. In generale, gli Autori non hanno osservato alcun eccesso di rischio associato con l'uso di contraccettivi orali di durata $\geq$ 1 anno in confronto al non utilizzo od all'utilizzo $<$ 1 anno (OR=0,86; 95% CI: 0,74-1,01). Gli studi non mostravano alcuna evidenza di eterogeneità.

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

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

Terapia ormonale sostitutiva in menopausa

Negli ultimi 20 anni, sono stati pubblicati diversi lavori scientifici che hanno investigato il rischio di melanoma e la terapia ormonale sostitutiva in menopausa (HRT), i cui risultati erano spesso contrastanti tra di loro, probabilmente perché la maggior parte di questi studi includevano solo pochi casi di donne che usavano l'HRT all'interno di una casistica più grande di donne che assumevano contraccettivi orali.

Recentemente, è stato pubblicato uno studio di *pool*-analisi (39) che ha analizzato in modo ampio il rischio di melanoma con la storia riproduttiva, l'uso di contraccettivi orali e la HRT. Gli Autori hanno analizzato i dati di 10 studi caso-controllo, pubblicati nel periodo 1985-2005, e non hanno trovato un rischio aumentato di melanoma nelle donne che erano state trattate con HRT.

In conclusione, i dati della letteratura scientifica indicano che non c'è associazione tra rischio di melanoma e HRT nelle donne trattate (40).

Melanomi multipli

Lo sviluppo di più di un melanoma primitivo multiplo (MPM) in un soggetto è un fenomeno ben documentato, che è stato descritto per la prima volta da Pack et al. nel 1952 (41). Da allora sono stati pubblicati diversi studi retrospettivi, i quali hanno riportato un'incidenza di MPM tra 1,2% e 8,2% nei soggetti con un melanoma primitivo.

Molti fattori di rischio associati con lo sviluppo di MPM sono stati identificati. Questi includono, come per il melanoma unico, una storia familiare positiva per MPM ed una storia individuale di nevi displastici (42-44).

In particolare, tra i soggetti con MPM, il 18-38% riportava una storia familiare positiva per melanoma (42) ed il 38-46% riportava una storia di nevi displastici (42,45).

L'analisi dell'intervallo di tempo tra il primo ed il secondo melanoma mostrava che il 51-59% dei soggetti con MPM aveva la diagnosi del secondo primitivo entro 12 mesi anche per effetto dell'aumentata attenzione diagnostica (41,42). Inoltre, in molti casi, la frequenza di un MPM può avere un *background* genetico e può essere associato con una storia familiare di melanoma.

La frequenza di mutazioni nel gene soppressore *CDKN2A* del tumore è < 2% in tutti i pazienti con melanoma, ma esso aumenta dal 8% al 12% nei pazienti con un sporadico MPM e del 47% in pazienti con MPM ed una positiva storia familiare (46).

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

Occupazione

L'esposizione alle radiazioni UV e le caratteristiche fenotipiche dei soggetti sono i più importanti e ben conosciuti fattori di rischio per il melanoma, ma dati recenti hanno suggerito che la combinazione di questi fattori non è sufficiente a spiegare completamente il rischio di melanoma (21,47). Tuttavia, il rischio non identificato può essere il risultato di fattori apparentemente meno importanti come l'esposizione

occupazionale a prodotti chimici e/o a radiazioni. Il ruolo dell'occupazione come fattore di rischio maggiore per il melanoma è stato largamente ignorato, tuttavia, quando preso in considerazione, è stato usato come un indicatore di stato socio-economico o per classificare le occupazioni svolte al chiuso o all'aperto.

In una recente revisione della letteratura scientifica sui fattori di rischio occupazionali non legati all'esposizione alla luce solare, Fortes e de Vries (47) hanno analizzato i risultati di 60 lavori internazionali (10 studi caso-controllo e 50 di coorte), su 110 lavori identificati, pubblicati nel periodo 1985-2005. Inoltre, hanno classificato gli studi secondo due *score*: a) studio convincente (i.e., buon disegno dello studio, più di 400 soggetti coinvolti, misura quantitativa dell'esposizione ed aggiustamento adeguato per l'esposizione alla luce solare e caratteristiche fenotipiche dei soggetti); b) studio meno convincente, che non soddisfa due o più delle caratteristiche dello studio convincente.

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

Incrementi di rischio di melanoma sono stati osservati anche tra i lavoratori esposti agli idrocarburi policiclici aromatici (PAH), al benzene, al tricloroetilene ed al cloruro di polivinile (PVC).

Tra i 15 studi considerati (3 studi caso-controllo e 12 di coorte), il rischio per i soggetti esposti rispetto ai non esposti era di 1,2-5,0. Tuttavia, gli studi non erano omogenei tra loro, tanto che solo 5 su 15 studi erano stati classificati come studi convincenti.

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

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

1.3 Prevenzione primaria

In generale, il melanoma potrebbe essere largamente prevenibile. Tuttavia, è difficile quantificare quanto la riduzione dell'incidenza e della mortalità del melanoma possa essere anticipata attraverso l'alterazione dell'esposizione al sole nei soggetti a rischio. Diversi studi inerenti alla variazione della numerosità dei nevi in relazione all'esposizione solare hanno valutato in che modo programmi di prevenzione, che agiscono sull'esposizione solare, possano far diminuire il rischio di melanoma.
Negli ultimi anni, sono stati pubblicati diversi studi clinici randomizzati, che hanno valutato gli interventi di educazione per aumentare l'uso di creme solari protettive e di altre misure di foto-protezione (indumenti, orari protetti, ecc.) nei bambini in età scolare e nei giovani adulti, mostrando spesso risultati modesti.
Nello studio clinico randomizzato sull'uso di creme solari protettive tra i bambini in età scolare, Gallagher et al. (48) hanno trovato una riduzione del 30-40% nell'insorgenza di nuovi nevi nel gruppo trattato con un supplemento di crema solare protettiva ad alto fattore di protezione ad integrazione della dose abituale rispetto al gruppo di controllo e che l'effetto di riduzione era più forte nei bambini con lentiggini.
Un risultato analogo, ma più modesto, è stato osservato anche nello studio di English et al. (49), dove gli Autori hanno osservato una riduzione del 3-11% di nevi nel gruppo trattato.
In contrasto, Naldi et al. (50) non hanno osservato alcun impatto significativo dei programmi educativi sulla riduzione delle scottature solari tra i bambini delle scuole elementari.
Tra gli studi randomizzati di comunità che hanno coinvolto una popolazione tra 16 e 65 anni, Weinstock et al. (51) hanno osservato che l'intervento educativo sull'uso di creme solari

protettive, tra i frequentatori di 7 spiagge del Rhode Island (USA), era stato efficace nell'83% dei soggetti coinvolti nello studio.
Successi più modesti sono stati riportati da altri Autori (52,53).
In conclusione, le raccomandazioni per la prevenzione primaria del melanoma dovrebbero enfatizzare di ridurre al minimo le esposizioni ai raggi solari e di evitare le scottature. Si dovrebbe evitare l'uso di lampade e lettini per acquisire o mantenere l'abbronzatura.
Inoltre, la prevenzione primaria dovrebbe agire sui bambini e sugli adolescenti informandoli sui danni di una eccessiva e non corretta esposizione ai raggi solari e sull'uso corretto delle creme solari protettive (Tabella 2).
In questo contesto, l'informazione che la luce solare è un fattore di precoce invecchiamento cutaneo è di particolare aiuto alle donne. Inoltre, la prevenzione primaria dovrebbe informare che alcuni soggetti sono più sensibili ai raggi solari a causa della loro suscettibilità genetica; questi soggetti presentano capelli rossi, occhi azzurri, lentiggini, pelle chiara con difficoltà ad abbronzarsi e una facilità a scottarsi (cute foto-tipo 1 e 2 di Fitzpatrick). L'autodeterminazione dei fattori di rischio noti, in quanto metodica già validata, ha permesso l'attuazione di specifici programmi di educazione sanitaria su larga scala, quali quelli rivolti ai genitori dei bambini in età scolare, al fine di indurre un'adeguata sensibilizzazione alla fotoprotezione.

Tabella 2 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 se di foto-tipo 1 e 2 o con difficoltà ad abbronzarsi o con facilità a scottarsi.
2	I bambini fino al 6° mese non devono essere esposti al sole.
3	Evita le esposizioni al sole nei climi caldi tra le ore 11-16 circa e non utilizzare al sole essenze e profumi.
4	Utilizza indumenti, cappello con visiera, camicie, magliette, occhiali.
5	Utilizza l'ombra naturale (alberi) e crea protezione come con ombrelloni, ecc.

segue

6	Ricordati che la migliore fotoprotezione è l'ombra e che un indumento appropriato protegge più di qualunque crema solare protettiva.
7	Usa, specie se la tua pelle è pallida, creme solari ad alta protezione che contengono filtri che bloccano non solo gli UVB, responsabili delle scottature, ma anche gli UVA.
8	Le creme solari protettive 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 piede, cuoio capelluto (se calvi).
10	Evita l'abbronzatura artificiale (lettini e lampade UVA) che, oltre tutto, invecchia precocemente la pelle.

BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France*: International Agency for Research on Cancer 2010; http://globocan.iarc.fr*
2. Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol 2009 Jan-Feb; 27(1):3-9*
3. Verdecchia A, Guzzinati S, Francisci S, De Angelis R, Bray F, Allemani C, Tavilla A, Santaquilani M, Sant M; EUROCARE Working Group. Survival trends in European cancer patients diagnosed from 1988 to 1999. *Eur J Cancer 2009 Apr; 45(6):1042-66*
4. AIOM, AIRTUM. I numeri del cancro in Italia 2011. *Intermedia editore, 2011 (in press)*
5. AIRTUM Working Group. I Tumori in Italia-Rapporto 2009. I trend dei tumori negli anni duemila (1998-2005). *Epidemiologia & Prevenzione Anno 33 (4-5) luglio-ottobre 2009 (supplemento n. 1); http://www.registri-tumori.it*
6. AIRTUM Working Group. I Tumori in Italia-Rapporto 2010. La prevalenza dei tumori in Italia. *Epidemiologia & Prevenzione Anno 34 (5-6) settembre-dicembre 2010 (supplemento n. 2); http://www.registri-tumori.it*
7. AIRTUM Working Group. I Tumori in Italia-Rapporto 2011. La sopravvivenza dei pazienti oncologici in Italia. *Epidemiologia & Prevenzione Anno 35 (5-6) settembre-dicembre 2011 (supplemento n. 3)*
8. Menzies SW. Is sun exposure a major cause of melanoma? Yes. *BMJ 2008; 337:a763*

9. Shuster S. Is sun exposure a major cause of melanoma? No. *BMJ 2008; 337:a764*
10. Elwood JM, Hislop TG. Solar radiation in the etiology of cutaneous malignant melanoma in Caucasians. *Natl Cancer Inst Monogr 1982; 62:167-71*
11. Armstrong BK. Epidemiology of malignant melanoma: intermittent or total accumulated exposure to the sun? *J Dermatol Surg Oncol 1988 Aug; 14(8):835-49*
12. National Institutes of Health summary of the Consensus Development Conference on Sunlight, Ultraviolet Radiation, and the Skin. Bethesda, Maryland, May 8-10, 1989. Consensus Development Panel. *J Am Acad Dermatol 1991 Apr; 24(4):608-12*
13. International Agency for Research on Cancer (IARC). Solar and ultraviolet radiation. Monographs on the evaluation carcinogenic risk to humans. *International Agency for Research on Cancer, Lyon 1992: vol. 55*
14. Noonan FP, Recio JA, Takayama H *et al*: Neonatal sunburn and melanoma in mice. *Nature* 2001; 413:271-2
15. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer 2005 Jan; 41(1):28-44*
16. Dennis LK, Vanbeek MJ, Beane Freeman LE, Smith BJ, Dawson DV, Coughlin JA. Sunburns and risk of cutaneous melanoma: does age matter? A comprehensive meta-analysis. *Ann Epidemiol 2008 Aug; 18(8):614-27*
17. Chang YM, Barrett JH, Bishop DT, Armstrong BK, Bataille V, Bergman W, Berwick M, Bracci PM, Elwood JM, Ernstoff MS, Gallagher RP, Green AC, Gruis NA, Holly EA, Ingvar C, Kanetsky PA, Karagas MR, Lee TK, Le Marchand L, Mackie RM, Olsson H, Østerlind A, Rebbeck TR, Sasieni P, Siskind V, Swerdlow AJ, Titus-Ernstoff L, Zens MS, Newton-Bishop JA. Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. *Int J Epidemiol 2009 Jun; 38(3):814-30*
18. Grulich AE, Bataille V, Swerdlow AJ, Newton-Bishop JA, Cuzick J, Hersey P, McCarthy WH. Naevi and pigmentary characteristics as risk factors for melanoma in a high-risk population: a case-control study in New South Wales, Australia. *Int J Cancer 1996 Aug 7; 67(4):485-91*
19. Bataille V, Grulich A, Sasieni P, Swerdlow A, Newton Bishop J, McCarthy W, Hersey P, Cuzick J. The association between naevi and melanoma in populations with different levels of sun exposure: a joint case-control study of melanoma in the UK and Australia. *Br J Cancer 1998; 77(3):505-10*
20. MacKie RM, McHenry P, Hole D. Accelerated detection with prospective surveillance for cutaneous malignant melanoma in high-risk groups. *Lancet 1993 Jun 26; 341(8861):1618-20*

21. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer 2005 Jan; 41(1):45-60*
22. Olsen CM, Carroll HJ, Whiteman DC. Estimating the attributable fraction for cancer: A meta-analysis of nevi and melanoma. *Cancer Prev Res (Phila) 2010 Feb; 3(2):233-45*
23. Peto J, Houlston RS. Genetics and the common cancers. *Eur J Cancer 2001 Oct; 37 Suppl 8:S88-96*
24. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, ctinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer 2005 Sep; 41(14):2040-59*
25. Olsen CM, Carroll HJ, Whiteman DC. Estimating the attributable fraction for melanoma: a meta-analysis of pigmentary characteristics and freckling. *Int J Cancer 2010 Nov 15; 127(10):2430-45*
26. Freedberg KA, Geller AC, Miller DR, Lew RA, Koh HK. Screening for malignant melanoma: A cost-effectiveness analysis. *J Am Acad Dermatol 1999 Nov; 41(5 Pt 1):738-45*
27. MacKie RM, McHenry P, Hole D. Accelerated detection with prospective surveillance for cutaneous malignant melanoma in high-risk groups. *Lancet 1993 Jun 26; 341(8861):1618-20*
28. Gallagher RP, Spinelli JJ, Lee TK. Tanning beds, sunlamps, and risk of cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005 Mar; 14(3):562-6*
29. International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet (UV) light and skin cancer. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer 2007 Mar 1; 120(5):1116-22*
30. Lazovich D, Vogel RI, Berwick M, Weinstock MA, Anderson KE, Warshaw EM. Indoor tanning and risk of melanoma: a case-control study in a highly exposed population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2010 Jun; 19(6):1557-68*
31. El Ghissassi F, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Cogliano V; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens-part D: radiation. *Lancet Oncol 2009 Aug; 10(8):751-2*
32. Autier P, Doré JF, Négrier S, Liénard D, Panizzon R, Lejeune FJ, Guggisberg D, Eggermont AM. Sunscreen use and duration of sun exposure: a double-blind, randomized trial. *J Natl Cancer Inst 1999 Aug 4; 91(15):1304-9*
33. Autier P, Doré JF, Reis AC, Grivegnée A, Ollivaud L, Truchetet F, Chamoun E, Rotmensz N, Severi G, Césarini JP. Sunscreen use and intentional exposure to ultraviolet A and B radiation: a double blind

randomized trial using personal dosimeters. *Br J Cancer 2000 Nov; 83(9):1243-8*
34. Huncharek M, Kupelnick B. Use of topical sunscreens and the risk of malignant melanoma: a meta-analysis of 9067 patients from 11 case-control studies. *Am J Public Health 2002 Jul; 92(7):1173-7*
35. Dennis LK, Beane Freeman LE, VanBeek MJ. Sunscreen use and the risk for melanoma: a quantitative review. *Ann Intern Med 2003 Dec 16; 139(12):966-78*
36. Autier P. Sunscreen abuse for intentional sun exposure. *Br J Dermatol 2009 Nov; 161 Suppl 3:40-5*
37. Pfahlberg A, Hassan K, Wille L, Lausen B, Gefeller O. Systematic review of case-control studies: oral contraceptives show no effect on melanoma risk. *Public Health Rev 1997; 25(3-4):309-15*
38. Karagas MR, Stukel TA, Dykes J, Miglionico J, Greene MA, Carey M, Armstrong B, Elwood JM, Gallagher RP, Green A, Holly EA, Kirkpatrick CS, Mack T, Østerlind A, Rosso S, Swerdlow AJ. A pooled analysis of 10 case-control studies of melanoma and oral contraceptive use. *Br J Cancer 2002 Apr 8; 86(7):1085-92*
39. Lens M, Bataille V. Melanoma in relation to reproductive and hormonal factors in women: current review on controversial issues. Cancer Causes Control 2008 Jun; 19(5):437-42
40. Gandini S, Iodice S, Koomen E, Pietro AD, Sera F, Caini S. Hormonal and reproductive factors in relation to melanoma in women: Current review and meta-analysis. *Eur J Cancer 2011 Nov; 47(17):2607-17. Epub 2011 May 26*
41. Pack GT, Scharnagel IM, Hillyer RA. Multiple primary melanoma. *Cancer 1952 nov; 5(6):1110-5*
42. Ferrone CR, Ben Porat L, Panageas KS, Berwick M, Halpern AC, Patel A, Coit DG. Clinicopathological features of and risk factors for multiple primary melanomas. *JAMA. 2005 Oct 5; 294(13):1647-54*
43. Manganoni AM, Farisoglio C, Tucci G, Facchetti F, Calzavara Pinton PG. The importance of self-examination in the earliest diagnosis of multiple primary cutaneous melanomas: a report of 47 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol 2007 Nov; 21(10):1333-6*
44. De Giorgi V, Rossari S, Papi F, Gori A, Alfaioli B, Grazzini M, Crocetti E, Verdelli A, Foo CW, Lotti T. Multiple primary melanoma: the impact of atypical naevi and follow up. *Br J Dermatol 2010 Dec; 163(6):1319-22*
45. Blackwood MA, Holmes R, Synnestvedt M, Young M, George C, Yang H, Elder DE, Schuchter LM, Guerry D, Ganguly A. Multiple primary melanoma revisited. *Cancer 2002 Apr 15; 94(8):2248-55*
46. Puig S, Malvehy J, Badenas C, Ruiz A, Jimenez D, Cuellar F, Azon A, Gonzàlez U, Castel T, Campoy A, Herrero J, Martí R, Brunet-Vidal J,

Milà M. Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *J Clin Oncol 2005 May 1; 23(13):3043-51*

47. Fortes C, de Vries E. Nonsolar occupational risk factors for cutaneous melanoma. *Int J Dermatol 2008; 47(4):319-28*
48. Gallagher RP, Rivers JK, Lee TK, Bajdik CD, McLean DI, Coldman AJ. Broad-spectrum sunscreen use and the development of new nevi in white children: A randomized controlled trial. *JAMA 2000 Jun 14; 283(22):2955-60*
49. English DR, Milne E, Jacoby P, Giles-Corti B, Cross D, Johnston R. The effect of a school-based sun protection intervention on the development of melanocytic nevi in children: 6-year follow-up. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2005 Apr; 14(4):977-80*
50. Naldi L, Chatenoud L, Bertuccio P, Zinetti C, Di Landro A, Scotti L, La Vecchia C; Oncology Cooperative Group of the Italian Group for Epidemiologic Research in Dermatology (GISED). Improving sun-protection behavior among children: results of a cluster-randomized trial in Italian elementary schools. The "SoleSi SoleNo-GISED" Project. *J Invest Dermatol 2007 Aug; 127(8):1871-7*
51. Weinstock MA, Rossi JS, Redding CA, Maddock JE. Randomized controlled community trial of the efficacy of a multicomponent stage-matched intervention to increase sun protection among beachgoers. *Prev Med 2002 Dec; 35(6):584-92*
52. Dietrich AJ, Olson AL, Sox CH, Tosteson TD, Grant-Petersson J. Persistent increase in children's sun protection in a randomized controlled community trial. *Prev Med 2000 Nov; 31(5):569-74*
53. Lowe JB, Ball J, Lynch BM, Baldwin L, Janda M, Stanton WR, Aitken JF. Acceptability and feasibility of a community-based screening programme for melanoma in Australia. *Health Promot Int 2004 Dec; 19(4):437-44*

2.0 GENESI

2.1 Vie genetico-molecolari coinvolte nella patogenesi del melanoma
2.2 Modello di sviluppo e progressione del melanoma
2.3 Classificazione molecolare

Negli ultimi anni è stato dimostrato che lo sviluppo e la progressione del melanoma, come quello di tutte le neoplasie maligne, sono basati sul coinvolgimento di specifici geni, nell'ambito di vari *pathway* molecolari, che risultano associati dal punto di visto funzionale. Approcci di analisi genetica e molecolare hanno consentito di identificare numerose alterazioni a carico di tali *pathway*, che sono coinvolti nella determinazione della storia biologica e clinica della malattia (patogenesi, prognosi, risposta terapeutica). Malgrado la notevole eterogeneità del melanoma dal punto di vista genetico e biologico, queste acquisizioni rendono possibile l'attuazione di una classificazione del melanoma in diversi "sottotipi molecolari", caratterizzati da differenti modalità di insorgenza e progressione, che risultano distinti dai sottogruppi tradizionali definiti dalle procedure di diagnosi convenzionale. Ciò viene a costituire la base per l'impiego di terapie più mirate ed efficaci (vedi sottocap. 11.4).

Introduzione

Il melanoma è una delle forme più aggressive di neoplasie maligne e la sua incidenza è in continuo aumento nella popolazione caucasica (1). Mentre il melanoma diagnosticato ad uno stadio precoce di malattia può essere efficacemente trattato con escissione chirurgica, gli stadi avanzati sono notoriamente refrattari alle terapie convenzionali. Negli ultimi anni, è stato dimostrato che il melanoma è caratterizzato da una spiccata eterogeneità molecolare, notevolmente maggiore a quella finora evidenziata dal punto di vista istopatologico (2,3). Pertanto, diventa sempre più impellente la necessità di ottenere una classificazione dei vari sottotipi di tumori con distinte caratteristiche genetiche e molecolari, abbandonando definitivamente il concetto che il melanoma sia, dal punto di vista biologico, una singola malattia. Nell'era della *target therapy*, diventa quindi fondamentale capire i complicati meccanismi biologici che sono alla base dello sviluppo e della progressione del melanoma, per poter classificare dal punto di

vista molecolare il tumore ed indirizzare il paziente verso la terapia più adeguata per il proprio tipo di aberrazione genetico-molecolare.
La patogenesi del melanoma, come di tutte le altre forme di neoplasie maligne, è basata sull'acquisizione di alterazioni sequenziali a carico di specifiche regioni di DNA e/o di particolari meccanismi coinvolti nella regolazione del funzionamento cellulare; i recenti progressi della genomica e proteomica hanno infatti consentito di caratterizzare la tumorigenesi come un processo ad accumulo di mutazioni in specifici geni e/o di anomalie in specifici *pathway* metabolico-molecolari (3,4).

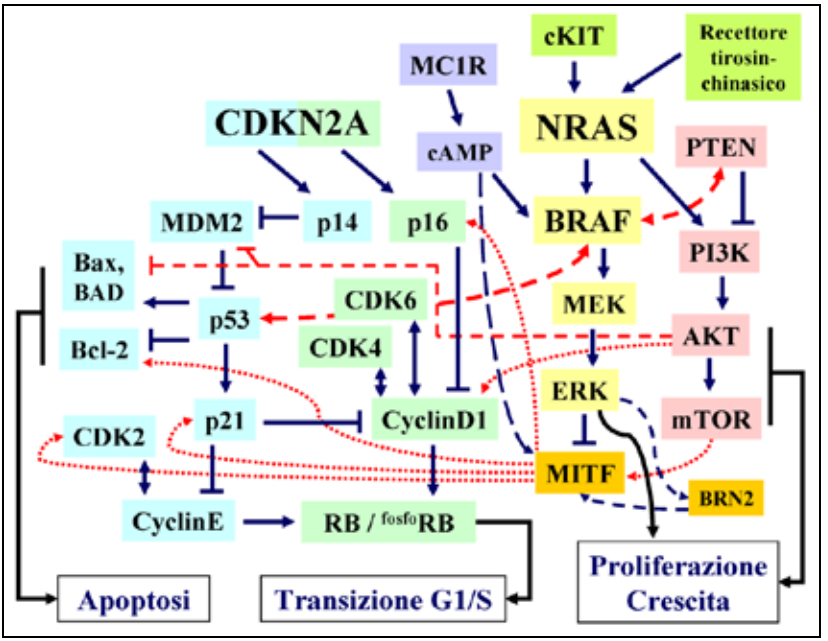
2.1 Vie genetico-molecolari coinvolte nella patogenesi del melanoma

Ad oggi, i seguenti geni, ed i *pathway* da essi dipendenti, sono stati dimostrati giocare un ruolo cruciale nella patogenesi del melanoma: *CDKN2A* ($p16^{CDKN2A}$-CDK4-RB e $p14^{CDKN2A}$-MDM2-p53 *pathway*), *NRAS-BRAF* (MAPK e PI3K-AKT *pathway*), *cKIT* e *MITF*.

CDKN2A
Il gene *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A* (*CDKN2A*) svolge un ruolo fondamentale sia nella suscettibilità sia nella patogenesi del melanoma (3,5). Esso è localizzato sul cromosoma 9p21 e codifica per due proteine: $p16^{CDKN2A}$ e $p14^{CDKN2A}$ (5).
Il gene *CDKN2A* è un oncosoppressore ed agisce con un meccanismo d'azione di tipo recessivo; pertanto, è necessaria l'inattivazione di entrambi gli alleli per lo sviluppo del melanoma. In particolare, mutazioni di questo gene sono 7-10 volte più frequenti nei pazienti con una forte storia di ricorrenza familiare di melanoma (tre o più membri della famiglia affetti), rispetto alla stragrande maggioranza (circa il 90%) di pazienti con malattia classificata come sporadica (6). Nei pazienti con familiarità, circa il 40% dei probandi può risultare portatore di una mutazione germinale di *CDKN2A*, con prevalenze che variano notevolmente nelle differenti popolazioni e nelle diverse aree geografiche (3,6). Nei pazienti sporadici, il gene può risultare inattivo a livello somatico fino al 70% dei casi (3-5).
In condizioni fisiologiche, $p16^{CDKN2A}$ inibisce il sistema di protein-chinasi *Cyclin-Dependent Kinase* 4 (CDK4)/*Cyclin D1* (CCND1), che, a sua volta, inibisce l'attività antiproliferativa della proteina RB (*retinoblastoma-susceptibility*) e permette la progressione nel ciclo

cellulare (3,5) (Figura 1). Nel melanoma, alterazioni del *pathway* $p16^{CDKN2A}$-CDK4-RB sono correlate alla progressione della malattia; assenti nei nevi, cominciano a manifestarsi nei tumori primari, fino ad aumentare nei melanomi metastatici e nelle linee cellulari di melanoma (3,4,7). Le due principali alterazioni riscontrate a carico di tale *pathway* sono l'inattivazione di $p16^{CDKN2A}$ e l'amplificazione di *CCND1*: la prima è dovuta a meccanismi genetici (mutazioni geniche, riarrangiamenti cromosomici) od epigenetici (metilazione di regioni promotrici), mentre la seconda si riscontra generalmente nei melanomi negativi per mutazioni nei geni *BRAF* e *NRAS*, che principalmente insorgono nelle mucose e nelle aree cutanee cronicamente esposte al sole (2). In una piccola frazione di melanomi metastatici (circa 15% dei casi), è stata tuttavia dimostrata la coesistenza di amplificazione di *CCND1* e mutazioni del gene *BRAF*, che sembra conferire resistenza alla terapia con inibitori di BRAF (8).
Analogamente, $p14^{CDKN2A}$ interferisce con le proteine *Murine Double Minute 2* (MDM2) e p53, prevenendo la degradazione di quest'ultima e favorendo il suo controllo della progressione del ciclo cellulare; l'incremento del livello di espressione di p53 in risposta ad un danno genotossico previene infatti la divisione cellulare ed induce l'apoptosi (9) (Figura 1). Nel melanoma, la riduzione dei livelli della proteina p53 contribuisce ad aumentarne l'aggressività e la refrattarietà alla terapia; l'inattivazione di p53 può essere dovuta a mutazioni di $p14^{CDKN2A}$ o ad aumentata espressione di MDM2 o, in alternativa, al silenziamento del gene *TP53* (principalmente, mediante un meccanismo funzionale epigenetico; la frequenza di mutazioni in tale gene è molto bassa) (3,6,9).

Figura 1 Principali *pathway* coinvolti nella patogenesi del melanoma



NRAS-BRAF

RAS e BRAF sono due importanti molecole che mediano la risposta delle cellule agli stimoli mitotici extracellulari e giocano un ruolo centrale nella regolazione della crescita, sopravvivenza e proliferazione cellulare.

I prodotti della famiglia dei geni RAS, piccole proteine legate alla membrana citoplasmatica, sono costituiti da 3 isoforme tessuto-specifiche: HRAS, KRAS e NRAS. Le mutazioni di *NRAS* sono quelle maggiormente riscontrate nel melanoma (nel 15-30% dei casi) (4,5,10,11). La stimolazione oncogenica di NRAS è in grado di attivare specifiche proteine citoplasmatiche con funzione chinasica poste a valle: RAF e *Phosphatidylinositol 3-Kinase* (PI3K) (10) (Figura 1).

La famiglia di chinasi RAF consiste di tre proteine (ARAF, BRAF e CRAF), che fanno tutte parte della cascata di trasduzione del segnale

nominata *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) *pathway* (12). Nei melanociti, BRAF induce l'attivazione della chinasi MEK, la quale, a sua volta, attiva ERK, che costituisce l'effettore finale della cascata MAPK (Figura 1). Nel melanoma, il gene *BRAF* risulta mutato nel 40-60% dei casi; la mutazione prevalente (circa il 90% dei casi) è rappresentata dalla sostituzione di una valina con acido glutammico al codone 600 (^{V600E}BRAF) (12,13). La variante ^{V600E}BRAF, come le restanti mutazioni a carico della regione chinasica di *BRAF*, inducono, attraverso la fosforilazione (attivante) di ERK, una continua stimolazione della proliferazione cellulare e della crescita tumorale. Tuttavia, la dimostrazione che *BRAF* è mutato anche nei nevi comuni (14) suggerisce che la sua attivazione oncogenica sia una condizione necessaria, ma non sufficiente, per lo sviluppo del melanoma.
Nei melanociti nevici, la presenza di mutazioni di *BRAF* è in grado di stimolare l'aumento di espressione di $p16^{CDKN2A}$ (con normali livelli di $p14^{ARF}$), con conseguente induzione dei meccanismi di senescenza cellulare ed arresto del ciclo cellulare. Questo fenomeno appare come una reazione "protettiva", in risposta a tale inappropriato segnale mitogeno (15). A conferma dell'importanza di questo equilibrio funzionale, l'espressione di $p16^{CDKN2A}$ risulta ridotta od assente in circa 1/3 dei melanomi con mutazione ^{V600E}BRAF (15). Analogamente, l'attivazione oncogenica di BRAF è in grado di promuovere significativamente la trasformazione maligna di melanociti carenti in p53 (16). Tutto questo conferma che BRAF mutato coopera con membri di entrambi i *pathway* di *CDKN2A* ($p16^{CDKN2A}$ e p53) (Figura 1).
I melanomi che insorgono in aree cutanee esposte in maniera intermittente al sole e che, quindi, non rappresentano i segni di un danno solare cronico, presentano la più alta frequenza di mutazioni del gene *BRAF* (2). Si può ipotizzare che i raggi ultravioletti siano in grado di indurre tali mutazioni oncogeniche solo se l'esposizione solare non è sufficientemente prolungata da causare i cambiamenti tessutali tipici dell'esposizione cronica al sole. Recentemente, è stato dimostrato che alcune varianti genetiche del recettore di membrana *Melanocortin-1 Receptor* (MC1R) non sono in grado di stimolare adeguatamente la produzione della melanina capace di proteggere la pelle dai danni dei raggi ultravioletti (17). La combinazione tra la presenza di tali varianti di *MC1R* e l'esposizione intermittente ai raggi ultravioletti solari (i quali sembrano determinare un incremento della produzione di radicali liberi a livello cutaneo) è considerata

responsabile dell'attivazione oncogenica di BRAF, attraverso un aumento indotto dei livelli intracellulari di AMP ciclico (17) (Figura 1).
A rendere ulteriormente complesso tale scenario è l'osservazione che, in presenza di mutazioni del gene *NRAS*, che sono state dimostrate essere mutuamente esclusive con le mutazioni del gene *BRAF* (2-5), la traduzione del segnale mitogeno nell'ambito del MAPK *pathway* è dirottato su CRAF, che pertanto viene ad acquisire un ruolo chiave nel mantenimento della stimolazione della proliferazione cellulare in questo sottogruppo di melanomi (18). Infatti, un aumentato livello di espressione di CRAF è responsabile dell'acquisizione di resistenza alla terapia con inibitori di BRAF (19). Questi dati hanno pertanto implicazioni nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche basate sulla combinazione di trattamenti inibenti simultaneamente BRAF e CRAF ovvero BRAF e PI3K, l'altro *pathway* attivato da *NRAS* mutato (20).

PI3K
Oltre a MAPK, il secondo sistema di regolazione della crescita cellulare, prevalentemente dipendente da RAS attivato (10), è costituito dal *pathway* incentrato sulla proteina PI3K e costituito dalla cascata di trasduzione del segnale delle proteine PTEN, PI3K e AKT (in particolare, l'isoforma AKT3 nel melanoma).
In condizioni fisiologiche, l'attività fosfatasica della proteina PTEN riduce il livello intracellulare dei fosfoinositoli PIP2 e PIP3 prodotti dall'attivazione di PIK3 (21). Quest'ultima determina infatti un aumento dei livelli intracellulari di PIP3 che vanno ad attivare AKT e, di conseguenza, il suo substrato mTOR, il quale è deputato a modulare la sintesi di proteine coinvolte nella sopravvivenza e crescita cellulare nonché nell'apoptosi (4,5) (Figura 1). Nel melanoma, il gene *PTEN* è deleto nel 30-40% dei casi sporadici (con perdita della corrispondente proteina nel 5-20% dei melanomi primari) e nel 30-50% delle linee cellulari (4,21). Aumentata espressione di AKT3 è presente nel 50% dei nevi displastici, nel 70% dei melanomi primari e nel 70% delle metastasi (21). L'attivazione di AKT: *a*) promuove la proliferazione cellulare attraverso l'induzione e la stabilizzazione di CCND1; *b*) inibisce l'apoptosi mediante l'inattivazione di molte proteine ad attività pro-apoptotica, quali BAD (antagonista di BCL-2, che invece ostacola i meccanismi di morte cellulare) e MDM2 (che causa la degradazione di p53; vedi sopra) (Figura 1) (3,5). Riassumendo, l'effetto combinato della perdita di PTEN e dell'attivazione del sistema PI3K-AKT, che si verifica nel melanoma, risulta in una crescita

aberrante delle cellule neoplastiche, con acquisizione di resistenza all'apoptosi e, quindi, di refrattarietà al trattamento chemioterapico.

MITF

Tra i prodotti genici che operano a valle del *pathway* di trasduzione del segnale BRAF-MEK-ERK, il più rilevante nel melanoma è rappresentato dal *Microphthalmia-associated Transcription Factor* (MITF) (22). In aggiunta al suo coinvolgimento nella pigmentazione cutanea, MITF sembra giocare un ruolo di primaria importanza nella proliferazione e differenziazione dei melanociti (23).

Il meccanismo d'azione di MITF è tuttavia alquanto complesso: una bassa od assente espressione di tale proteina predispone la cellula all'apoptosi; livelli intermedi di espressione di MITF promuovono la proliferazione e la sopravvivenza cellulare; elevate quantità di MITF all'interno della cellula producono un effetto antiproliferativo (22,23). Nel melanoma, si sono probabilmente sviluppate strategie per mantenere i livelli intracellulari della proteina MITF in un *range* compatibile con gli altri meccanismi di tumorigenesi. A conferma di ciò, è stato dimostrato che l'attivazione costitutiva di ERK, stimolata da mutazioni oncogeniche di BRAF, risulta associata ad una marcata degradazione di MITF (24). E' stato pertanto ipotizzato che l'attivazione oncogenica di BRAF sia in grado di controllare i livelli intracellulari di MITF attraverso un fine bilanciamento di due meccanismi opposti: una riduzione diretta dei livelli di MITF mediante stimolazione della sua degradazione ed un aumento indiretto della quantità di tale proteina mediante attivazione di un fattore di trascrizione (BRN2), il quale, a sua volta, stimola l'espressione di MITF (24) (Figura 1). Analogamente, nelle cellule di melanoma MITF interagisce con numerosi effettori che svolgono azioni contrapposte, quali CDK2 e BCL-2, che promuovono la progressione del ciclo cellulare e la riduzione dell'apoptosi, favorendo la proliferazione neoplastica, ovvero p21 e $p16^{CDKN2A}$, che invece inducono l'arresto del ciclo cellulare e l'attivazione dei meccanismi di senescenza cellulare (24) (Figura 1).

Bassi livelli intracellulari della proteina MITF sono stati riscontrati nei melanomi invasivi e sono stati associati ad una peggiore prognosi ed alla progressione clinica di malattia (25). L'amplificazione del gene *MITF* è stata osservata in circa il 15-20% dei melanomi metastatici portatori di mutazioni di BRAF. Tale fenomeno potrebbe essere dovuto ad una sorta di bilanciamento funzionale in risposta

alla riduzione dei livelli della proteina indotta da BRAF mutato e la sua presenza è associata ad aumento della resistenza alla chemioterapia (24).

c-KIT
c-KIT è il recettore tirosin-chinasico per lo *stem cell factor*, che nei melanociti regola migrazione e sopravvivenza cellulare. Sebbene subisca frequentemente perdita di espressione nei melanomi, particolari alterazioni del recettore sono coinvolte nella patogenesi di alcuni sottogruppi di queste neoplasie. Anche se complessivamente meno frequenti delle mutazioni di *BRAF* e *NRAS*, specifiche variazioni di sequenza del gene *c-KIT* causano attivazione costitutiva del dominio chinasico, risultando in un'induzione continua della proliferazione cellulare, attraverso la stimolazione del MAPK *pathway* (26) (Figura 1). Le mutazioni di *c-KIT* sono state descritte nei melanomi acrali (10% dei casi), mucosali (15-20% dei casi) ed insorti nelle aree cutanee cronicamente esposte al sole (5% dei casi) (2,27).
In aggiunta alle mutazioni, si osservano anche amplificazioni geniche di *c-KIT*; infatti, circa 1/3 di melanomi con *cKIT* mutato presentano un aumento del numero di copie geniche (27). Considerando insieme entrambe le alterazioni (mutazioni ed amplificazioni), circa 1/4 di melanomi delle mucose ed acrali sono caratterizzati dalla presenza di un'aberrazione genomica di *c-KIT* (27). Non è stata descritta una marcata coesistenza di mutazioni di *BRAF* o *NRAS* ed alterazioni di *c-KIT* (2).

2.2 Modello di sviluppo e progressione del melanoma

Lo scenario patogenetico presentato precedentemente non può essere considerato comprensivo di tutte le alterazioni molecolari che in questi ultimi anni sono state descritte nel melanoma. Tra queste, sono da menzionare le alterazioni dei seguenti effettori: *GNAQ/GNA11*, geni che codificano proteine di trasmissione del segnale in grado di attivare MAPK e che risultano mutati nei nevi e melanomi blu nonché nel 50% circa dei melanomi uveali primitivi e metastatici (28); *WNT*, che sembra contribuire all'inibizione dell'apoptosi nelle cellule di melanoma; è stato recentemente suggerito che il livello di espressione proteica della isoforma WNT2 possa rappresentare un marcatore di trasformazione maligna melanocitaria ed essere utilizzato per

la diagnosi differenziale tra nevi e melanomi (29); *iNOS*, che regola il livello intracellulare di ossido nitrico, un radicale libero coinvolto nella induzione della apoptosi, il cui aumento di produzione può stimolare lo sviluppo e la progressione del melanoma (30); NF-kB e Hedgehog (frequentemente attivati nel melanoma, contribuendo alla progressione della malattia) (5); c-MET, un recettore di membrana attivato dal legame con HGF (*Hepatocyte Growth Factor)*, la cui aumentata espressione, spesso associata ad amplificazione genica, è coinvolta nell'aumento di invasività e malignità del melanoma (31). Inoltre, è stato recentemente dimostrato che il microambiente tumorale (alterata distribuzione e concentrazione di chemochine, mancata attivazione di immunità cellulo-mediata, induzione di meccanismi immuno-soppressivi) gioca un ruolo importante nel processo di formazione e mantenimento delle metastasi di melanoma (32,33). In particolare, sono da riportare le alterazioni dei seguenti componenti: Endoteline, proteine di trasmissione del segnale, fisiologicamente essenziali per lo sviluppo melanocitario dalla cresta neurale, la cui aumentata espressione è associata al processo metastatico nel melanoma (34,35) e Chemochine (l'incremento di alcune di queste proteine e dei relativi recettori, in particolare CXCR6, CCR9 e XCR1, favorisce la progressione nel melanoma) (32,36).

Malgrado tale complessità, vanno acquisendo un ruolo sempre più determinante dal punto di vista patogenetico le interazioni tra le diverse vie genetico-molecolari precedentemente descritte (Figura 1). Considerando nel suo complesso i diversi *pathway* come un'unica rete funzionale, sono compresi meglio i motivi per cui, nel melanoma, possano coesistere, oppure no, alterazioni imputabili all'influenza dei diversi geni. A titolo esemplificativo, le mutazioni di *BRAF* possono essere riscontrate insieme alle alterazioni di *PI3K*, ma nessuna di esse coesiste con quelle di *NRAS*: *BRAF* e *PI3K* sono attivati a valle di NRAS, per cui la presenza di mutazioni attivanti *NRAS* rende superflua l'attivazione di *BRAF* e *PI3K*. Analogamente, le mutazioni oncogeniche di *BRAF* riescono ad attivare più intensamente ERK, a valle del MAPK *pathway*, in presenza di alterazioni dei meccanismi intracellulari di controllo della senescenza e/o dell'apoptosi.

Dovendo semplificare questi complessi processi che sottintendono le diverse fasi dello sviluppo e progressione del melanoma, si possono così raggruppare le principali alterazioni molecolari patogenetiche:

- mutazioni oncogeniche del gene *BRAF*, i riarrangiamenti (rappresentati principalmente dalle delezioni alleliche) del cromosoma 9p21 e l'aumento dell'espressione proteica di AKT3 sono coinvolte nella fase di stimolazione della proliferazione dei melanociti (***fase iniziale pre-neoplastica***);
- alterazioni che causano disfunzione dei meccanismi di controllo della senescenza cellulare e di quelli che regolano l'apoptosi e la sopravvivenza cellulare (che vedono particolarmente coinvolti gli effettori dei *pathway* dipendenti da *CDKN2A*: deficit funzionale di $p16^{CDKN2A}$, amplificazione di *CCND1*, inattivazione di *TP53* attraverso una deregolazione del sistema $p14^{CDKN2A}$-MDM2-p53), le mutazioni attivanti *NRAS* e le aberrazioni di *c-KIT* sono coinvolte nella fase di trasformazione neoplastica che porta allo sviluppo del melanoma (***fase intermedia neoplastica***);
- silenziamento genico di $p16^{CDKN2A}$, la perdita funzionale di PTEN, l'attivazione del sistema PI3K-AKT e l'amplificazione del gene *MITF* sono coinvolte nella fase di acquisizione di un fenotipo maggiormente maligno ed aggressivo che porta alla progressione del melanoma (***fase finale metastatica***).

L'insieme di tali informazioni è fortemente indicativa dell'esistenza di complessi meccanismi molecolari di regolazione, che provvedono a garantire l'integrità e la regolarità delle diverse funzioni cellulari nei melanociti normali. La progressione dai melanociti normali a quelli trasformati in senso maligno, fino ad arrivare alla formazione delle cellule aggressive metastatiche, è pertanto il risultato della stretta combinazione di alterazioni, aumento o riduzione, dell'attività degli effettori che agiscono nei vari *pathway* molecolari.

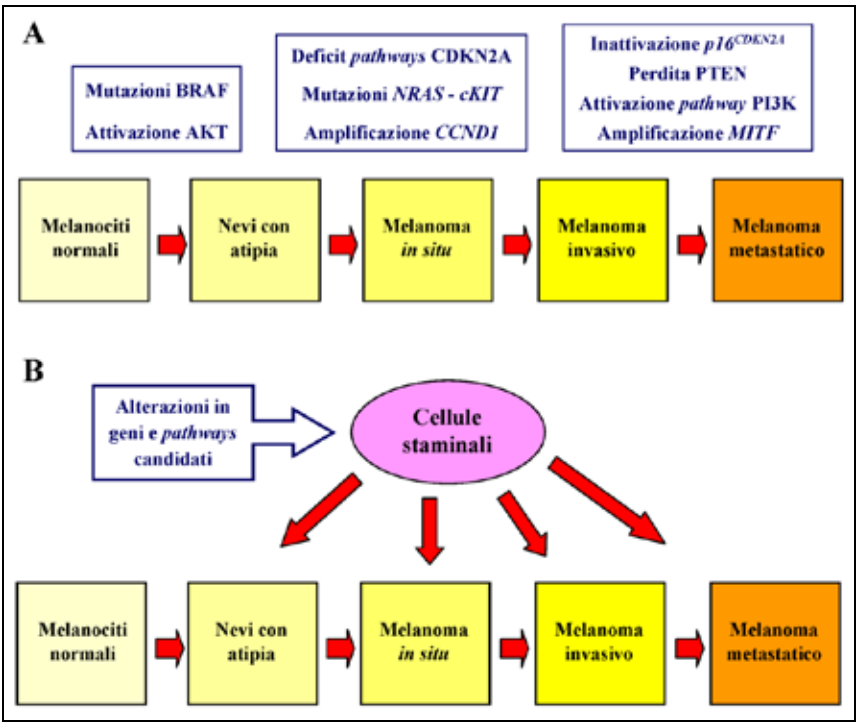
E' stato così sviluppato un modello di melanomagenesi di tipo lineare, basato sull'accumulo progressivo delle alterazioni molecolari descritte in precedenza (3,5) (Figura 2A).

Recentemente, si è tuttavia ipotizzata l'esistenza, in un numero non ancora quantificato di casi, di una seconda via di trasformazione neoplastica melanocitaria (di tipo "non lineare"), che vede il coinvolgimento di cellule staminali tessutali, le cui alterazioni darebbero direttamente origine a cellule di melanoma in fase di crescita superficiale oppure verticale ovvero, addirittura, in fase metastatica (37,38,39) (Figura 2B).

Questa seconda ipotesi si basa sull'evidenza di alcune incongruenze del modello di tumorigenesi progressiva in alcuni sottogruppi

di melanomi, quali una maggiore incidenza di mutazioni *BRAF* nei melanomi a crescita verticale rispetto a quelli a crescita superficiale, nonché l'osservazione di amplificazioni delle regioni genomiche 9p21 e 1p22 in maniera prevalente nei melanomi nodulari (37).

Figura 2 Modelli di sviluppo e progressione del melanoma



A: modello sequenziale **B**: modello non lineare.

2.3 Classificazione molecolare

Tutte queste acquisizioni rappresentano una chiara indicazione dell'esistenza di distinti sottotipi molecolari di melanoma. Dal punto di vista pratico, la caratterizzazione di tali sottotipi diventa estremamente importante ai fini di un più corretto indirizzo terapeutico, soprattutto oggi, dopo l'introduzione nella pratica clinica

di terapie biologiche mirate, *target therapies*, e di una più appropriata definizione della prognosi nei pazienti con melanoma.
Qui di seguito sono schematizzati i principali sottotipi di melanoma, sulla base delle caratteristiche molecolari:

1. Sottotipo MAPK
Presenza di mutazioni di *BRAF*, le quali possono trovarsi associate, soprattutto nelle lesioni della fase avanzata di malattia, ad inattivazione di *TP53*, con tendenza all'aumento dell'espressione di fosfo-ERK (forma fosforilata/attivata di ERK). Tale sottotipo beneficia del trattamento con inibitori di BRAF.
Le mutazioni di *BRAF* possono coesistere con altre alterazioni molecolari, con conseguente costituzione dei seguenti ulteriori sottogruppi di pazienti:

a. attivazione del sistema PI3K-AKT-mTOR, con aumento dei livelli di espressione di AKT3 e/o perdita di PTEN. Tale sottotipo beneficia anche del trattamento con inibitori di PI3K, AKT o mTOR;
b. alterazioni del *pathway* $p16^{CDKN2A}$-CDK4-RB, con riduzione dell'espressione di $p16^{CDKN2A}$ e/o amplificazione di CDK4. Tale sottotipo beneficia anche del trattamento con inibitori di CDK;
c. amplificazioni di *MITF* $\pm$ associate a riduzione dei livelli di espressione proteica. Tale sottotipo beneficia anche del trattamento con inibitori di HDAC (*Histone Deacetylase*), che è stato dimostrato interferire con l'espressione della proteina MITF.

2. Sottotipo NRAS
Presenza di mutazioni di *NRAS*, con aumento dei livelli di espressione di fosfo-ERK, associate ad eventuale attivazione di AKT. Tale sottotipo beneficia del trattamento con inibitori di MEK o PI3K, nonché con inibitori specifici di *farnesyl transferasi*, anche se finora non sono stati prodotti dati significativi relativi a quest'ultimo tipo di trattamento.

3. Sottotipo c-KIT
Presenza di mutazioni di *c-KIT* $\pm$ amplificazione genica e/o aumento dei livelli di espressione proteica. Tale sottotipo beneficia del trattamento con inibitori di c-KIT, anche se solo alcune mutazioni, in particolare, le varianti K642E e L576P nonché quelle dell'esone 11- sono principalmente responsive.

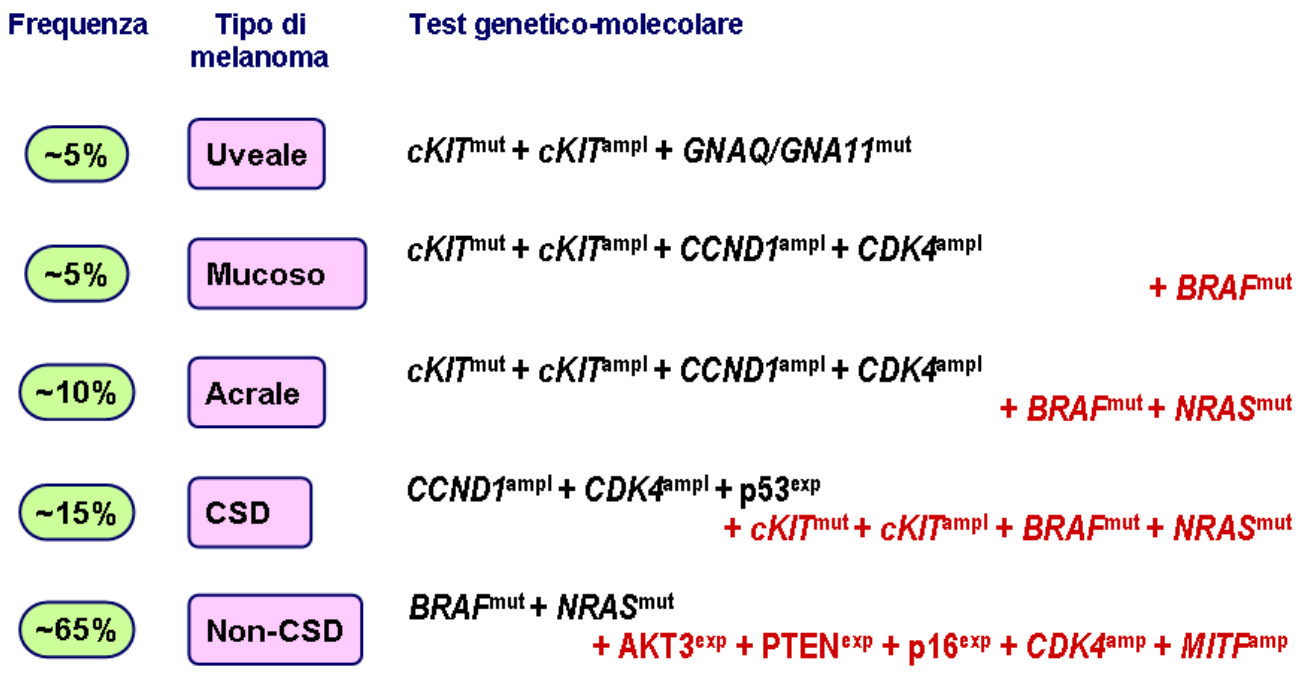
4. Sottotipo GNAQ/GNA11
Presenza di mutazioni di *GNAQ/GNA11*, con aumento dei livelli di espressione di fosfo-ERK. Tale sottotipo beneficia del trattamento con inibitori di MEK.

Considerando invece la sede cutanea di insorgenza del melanoma primitivo, si possono così sintetizzare le principali alterazioni genetico-molecolari più frequentemente osservate:

- *Melanoma acrale*
  Mutazioni ± amplificazione di *c-KIT*; amplificazione di *CDK4* o *CCND1* (associata ad aumento dei livelli di espressione delle relative proteine); amplificazione delle regioni genomiche 11q13, 22q11-13 e 5p15.
- *Melanoma della regione testa-collo e delle aree cutanee esposte cronicamente al sole (CSD)*
  Amplificazione di *CDK4* e/o *CCND1*; aumento dei livelli di espressione della proteina p53; mutazioni ± amplificazione di *c-KIT* (in circa il 5% dei casi).
- *Melanoma del tronco e delle aree cutanee non esposte cronicamente al sole (non-CSD)*
  Mutazioni di *BRAF* o *NRAS*, con eventuale coesistenza delle alterazioni molecolari associate alle mutazioni *BRAF* (vedi sopra); tendenza alla riduzione di espressione della proteina p53; presenza di specifiche variazioni polimorfiche del gene *MC1R*.
- *Melanoma delle mucose*
  Mutazioni ± amplificazione di *c-KIT*; amplificazione di *CCND1*; mutazioni di *BRAF* (in meno del 10% dei casi).
- *Melanoma uveale*
  Mutazioni ± amplificazione di *c-KIT*; mutazioni di *GNAQ* e/o *GNA11*.

Sulla base di queste evidenze, è possibile sviluppare un primo schema delle indagini molecolari da attuare nei melanomi delle diverse sedi anatomiche (Figura 3). In prospettiva, tale *flow-chart* è destinata ad arricchirsi sulla base della progressiva identificazione e validazione di nuove alterazioni genetico-molecolari correlate alla malattia.

Figura 3 Elenco delle indagini genetiche e molecolari nei diversi melanomi



ampl: amplificazione genica mediante analisi citogenetica.
exp: espressione proteica mediante analisi immunoistochimica.
mut: variazione nucleotidica mediante analisi mutazionale.
In rosso: indagini genetico-molecolari per alterazioni meno frequenti.

Infine, una recente meta-analisi ha validato alcune tra le aberrazioni precedentemente descritte per il loro ruolo nella prognosi (40) (vedi cap. 9.0):

- *fattori prognostici negativi/sfavorevoli*
  perdita di espressione di p53; aumento di espressione di iNOS, AP-2, MMP-2 e metallothioneine; elevato indice di proliferazione Ki-67;
- *fattori prognostici positivi/favorevoli*
  riduzione di espressione di $p16^{CDKN2A}$; aumento di espressione di BCL-2 e ATF-2. La presenza contemporanea di queste alterazioni, associata all'aumento di espressione di beta-catenina, fibronectina e p21 è stata confermata capace di influire favorevolmente sulla prognosi, in un secondo studio (41).

Da quanto sopra riportato, diventa evidente che una più approfondita conoscenza dei bersagli molecolari consente di identificare marcatori in grado di predire sia la prognosi (valore prognostico) sia la risposta terapeutica a specifici trattamenti (valore predittivo), nei pazienti con melanoma. In questo ultimo caso, è ormai chiaro che l'introduzione di composti antitumorali mirati su bersagli genici in combinazione con le terapie convenzionali rende necessaria una più appropriata selezione dei pazienti da indirizzare ai vari trattamenti innovativi. E' infatti alquanto improbabile che l'attuazione di una terapia mirata contro un componente dei *pathway* molecolari patogenetici possa produrre una significativa risposta antitumorale in pazienti non selezionati per alterazioni in quello specifico bersaglio.
Per tali motivi, la classificazione molecolare sarà sempre più parte integrante della diagnosi e stadiazione dei pazienti con melanoma fornendo informazioni insostituibili per la sperimentazione di nuovi approcci terapeutici.

BIBLIOGRAFIA

1. Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P. Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX. *IARC Scientific Publications 2007; No. 160, Lyon, IARC*
2. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC.

Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med 2005; 353(20):2135-47*
3. Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. *N Engl J Med 2006; 355(1):51-65*
4. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *The Lancet 2005, 365:687-701*
5. Palmieri G, Capone ME, Ascierto ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, Sini MC, Palla M, Mozzillo N, Ascierto PA. Main roads to melanoma. *J Transl Med 2009; 7:86*
6. Meyle KD, Guldberg P. Genetic risk factors for melanoma. *Hum Genet. 2009; 126(4):499-510*
7. Casula M, Muggiano A, Cossu A, Budroni M, Caracò C, Ascierto PA, Pagani E, Stanganelli I, Canzanella S, Sini MC, Palomba G, The Italian Melanoma Intergroup (IMI), Palmieri G. Role of key-regulator genes in melanoma susceptibility and pathogenesis among patients from South Italy. *BMC Cancer 2009; 9:352*
8. Smalley KS, Lioni M, Dalla Palma M, Xiao M, Desai B, Egyhazi S, Hansson J, Wu H, King AJ, Van Belle P, Elder DE, Flaherty KT, Herlyn M, Nathanson KL. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther 2008; 7(9):2876-83*
9. Box NF, Terzian T. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res 2008; 21:525-33*
10. Giehl K. Oncogenic Ras in tumor progression and metastasis. *Biol Chem 2005; 386:193-205*
11. Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol 2006; 126(1):154-60*
12. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol 2004; 5:875-85*
13. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho J, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature 2002; 417(6892):949-54*
14. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet 2003; 33(1):19-20*

15. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, Majoor DM, Shay JW, Mooi WJ, Peeper DS. $BRAF^{E600}$-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature 2005; 436:720-4*
16. Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF, Murphey RD, Berghmans S, Mayhall EA, Traver D, Fletcher CD, Aster JC, Granter SR, Look AT, Lee C, Fisher DE, Zon LI: BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol 2005; 15:249-54*
17. Fargnoli MC, Pike K, Pfeiffer RM, et al. MC1R variants increase risk of melanomas harboring BRAF mutations. *J Invest Dermatol 2008; 128:2485-90*
18. Dumaz N, Hayward R, Martin J, Ogilvie L, Hedley D, Curtin JA, Bastian BC, Springer C, Marais R. In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res 2006; 66:9483-91*
19. Montagut C, Sharma SV, Shioda T, McDermott U, Ulman M, Ulkus E, Dias-Santagata D, Stubbs H, Lee DY, Singh A, Drew L, Haber DA, Settleman J. Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res 2008; 68(12):4853-61*
20. Jaiswal BS, Janakiraman V, Kljavin NM, Eastham-Anderson J, Cupp JE, Liang Y, Davis DP, Hoeflich KP, Seshagiri S. Combined targeting of BRAF and CRAF or BRAF and PI3K effector pathways is required for efficacy in NRAS mutant tumors. *PLoS One 2009; 4:e5717*
21. Arcaro A, Guerreiro AS. The phosphoinositide 3-kinase pathway in human cancer: genetic alterations and therapeutic implications. *Curr Genomics 2007; 8:271-306*
22. Wellbrock C, Rana S, Paterson H. Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PLoS ONE 2008; 3:2734*
23. Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet 2004; 38:365-411*
24. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhim R, Milner DA, Granter SR, Du J, Lee C, Wagner SN, Li C, Golub TR, Rimm DL, Meyerson ML, Fisher DE, Sellers WR. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature 2005; 436:117-22*
25. Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Döbbeling U, Kobert N, Schaerer L, Hemmi S, Dummer R. In vivo switching of human

melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res 2008; 68:650-6*
26. Smalley KSM, Vernon K, Weber S, Weber J. Review: c-Kit signaling as the driving oncogenic event in sub-groups of melanomas. histology and histopathology cellular and molecular biology. *J Pathol 2009; 29:643-50*
27. Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, Patterson J, Town A, Harlow A, Cruz F 3rd, Azar S, Rubin BP, Muller S, West R, Heinrich MC, Corless CL. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res 2008; 14(21):6821-8*
28. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, Simpson EM, Barsh GS, Bastian BC. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature 2009; 457(7229):599-602*
29. Kashani-Sabet M, Range J, Torabian S, Nosrati M, Simko J, Jablons DM, Moore DH, Haqq C, Miller III Jr, Sagebiel RW. A multi-marker assay to distinguish malignant melanomas from benign nevi. *Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106:6268-72*
30. Sikora AG, Gelbard A, Davies A, Sano D, Ekmekcioglu S, Kwon J, Hailemichael Y, Jayaraman P, Myers JN, Grimm EA, Overwijk W. Targeted inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits growth of human melanoma in vivo and synergizes with chemo-therapy. *Clin Cancer Res 2010; 16(6):1834-44*
31. Yoon-Jin L, Dae-Hyun K, Sang-Han L, Dong-Wook K, Hae-Seon N, Moon Kyun C. Expression of the c-Met proteins in malignant skin cancers. *Ann Dermatol 2011; 23:33-8*
32. Gajewski TF, Fuertes M, Spaapen R, Zheng Y, Kline J. Molecular profiling to identify relevant immune resistance mechanisms in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol 2011; 23:286-92*
33. Braeuer RR, Zigler M, Villares GJ, Dobroff AS, Bar-Eli M. Transcriptional control of melanoma metastasis: the importance of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol 2011; 21:83-8*
34. Bagnato A, Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Tecce R, Natali PG. Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in melanoma cell progression. *Cancer Res 2004; 64:1436-43*
35. Saldana-Caboverde A, Kos L. Roles of endothelin signaling in melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res 2010; 23:160-70*
36. Seidl H, Richtig E, Tilz H, Stefan M, Schmidbauer U, Asslaber M, Zatloukal K, Herlyn M, Schaider H. Profiles of chemokine receptors in melanocytic lesions: de novo expression of CXCR6 in melanoma. *Hum Pathol 2007; 38:768-80*

37. Zabierowski SE, Herlyn M. Melanoma stem cells: the dark seed of melanoma. *J Clin Oncol 2008; 26:2890-94*
38. Fukunaga-Kalabis M, Roesch A, Herlyn M. From cancer stem cells to tumor maintenance in melanoma. J Invest Dermatol 2011; 131:1600-4.
39. Taghizadeh R, Noh M, Huh YH, Ciusani E, Sigalotti L, Maio M, Arosio B, Nicotra MR, Natali P, Sherley JL, La Porta C. ACXCR6, a newly defined biomarker of tissue-specific stem cell asymmetric self-renewal, identifies more aggressive human melanoma cancer stem cells. *PLoS One 2010 Dec 22; 5(12):e15183*
40. Gould Rothberg BE, Bracken MB, Rimm DL. Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst 2009; 101:452-74*
41. Gould Rothberg BE, Berger AJ, Molinaro AM, Subtil A, Krauthammer MO, Camp RL, Bradley WR, Ariyan S, Kluger HM, Rimm DL. Melanoma prognostic model using tissue microarrays and genetic algorithms. *J Clin Oncol 2009; 27:5772-80*

3.0 MELANOMA FAMILIARE

3.1 Modello generale di suscettibilità
3.2 Consulenza e test genetico
3.3 Prospettive future

Negli ultimi vent'anni, si è assistito ad un rapido incremento dell'incidenza del melanoma, che è stato messo essenzialmente in relazione all'aumentata esposizione intermittente ai raggi ultravioletti (UV) delle popolazioni caucasiche (vedi cap. 1.0 e 2.0).
Il rischio di sviluppare il melanoma viene anche correlato a:

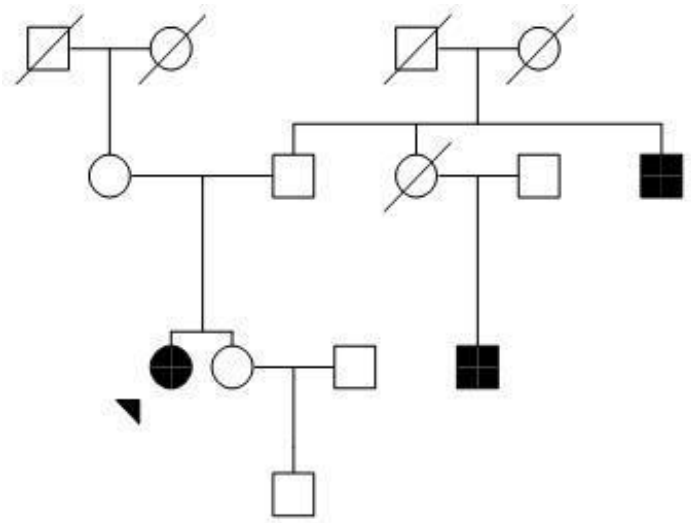
- positività per anamnesi familiare o individuale per melanoma;
- presenza di nevi multipli o atipici;
- immunosoppressione;
- fotosensibilità.

Ciascuno di questi fattori favorenti può essere considerato come una predisposizione costitutiva con differente penetranza e/o un elemento di *stress* ambientale che determina, nell'ambito di una complessa interazione tra i diversi fattori costitutivi, la genesi del melanoma (vedi cap. 2.0).
In questo capitolo viene focalizzata l'attenzione al primo punto, come espressione di una rilevante componente genetico-ereditaria, che si esplica principalmente attraverso l'azione di alcuni geni responsabili del controllo proliferativo e metabolico della cellula melanocitica, anche se modulata dall'interazione con l'ambiente (1-3) (vedi cap. 1.0 e 2.0).
Le difficoltà inerenti alla terapia della fase avanzata (vedi cap. 11.0) evidenziano quanto sia ancora incompleta la comprensione dei meccanismi molecolari responsabili della crescita verticale, dell'invasività e dello sviluppo della resistenza alla terapia del melanoma.
I programmi di sorveglianza e di diagnosi precoce acquisiscono pertanto sempre più il valore di strumenti fondamentali per diminuire morbilità e mortalità (vedi cap. 6.0). Per aumentare l'efficienza di questi programmi, è pertanto fondamentale l'identificazione di coorti ad alto rischio (1).

3.1 Modello generale di suscettibilità

Come per altre neoplasie, è stato possibile documentare il coinvolgimento di diversi geni nelle fasi iniziali di sviluppo e di progressione del melanoma. Alcuni di questi geni codificano per proteine che controllano direttamente il ciclo cellulare e che, se mutati a livello germinale, aumentano in modo altamente significativo il rischio dell'individuo di sviluppare il melanoma (geni ad alta penetranza). Un rischio inferiore sembra invece conferito ad un'altra classe di geni (geni a bassa penetranza), le cui variazioni sono frequenti nella popolazione e che sembrano modificare il rischio conferito dai geni ad alta penetranza, od agire anche attraverso l'interazione con altri geni a bassa penetranza o l'ambiente.
Pertanto, il modello di suscettibilità ad oggi più accreditato, come si vedrà in dettaglio, in particolare per i casi di aggregazione familiare del melanoma, può essere considerato quello di un'eredità complessa: oltre al determinante contributo di un gene maggiore di suscettibilità ad alta penetranza, intervengono quelli non trascurabili di uno o più geni modificatori a bassa penetranza e dell'esposizione (interazione GENE/gene(i)/ ambiente) (4).
Il melanoma familiare, che rappresenta circa il 10-12% dei casi totali, è generalmente definito in base alla presenza di 2 o più individui affetti distribuiti in 2 o 3 generazioni di uno stesso ramo familiare, ma questo criterio, come si vedrà in seguito, può variare in relazione all'incidenza della neoplasia stessa, nella particolare regione geografica (5).
Per molte famiglie si è potuto accertare un modello di trasmissione ereditaria della suscettibilità di tipo autosomico dominante, a penetranza incompleta ed espressività variabile (Figura 1).

Figura 1

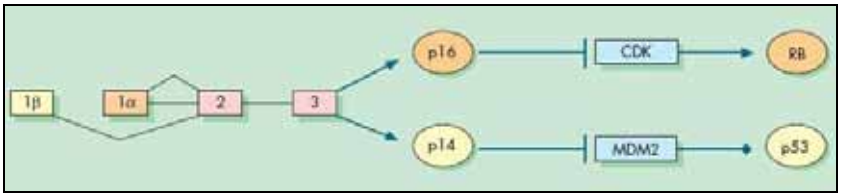


Esempio di melanoma familiare. La probanda III-1 è affetta da melanoma superficiale, mentre i soggetti III-4 e II-5 da melanoma nodulare (espressività variabile). I soggetti II-2 e II-3 sono portatori di mutazione, ma non hanno sviluppato la malattia nell'arco della vita (penetranza incompleta).

Nelle famiglie con 3 o più affetti, una percentuale variabile compresa tra il 20% ed il 40% risulta positiva per mutazioni germinali a carico di *CDKN2A* al locus 9p21 (6), mentre una percentuale < 5% è portatrice di mutazioni a carico del gene *CDK4*(12q), che codifica per la proteina bersaglio di *p16* (7).
Il gene *CDKN2A*, localizzato nella regione 9p21, codifica per due proteine ad azione di oncosoppressore:

- p16, coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare come inibitore delle chinasi ciclino-dipendenti CDK4 e CDK6;
- p14arf (prodotto di uno *splicing* alternativo con l'esone 1 beta), coinvolta nella stabilizzazione di p53 (Figura 2).

Figura 2 Organizzazione del gene *CDKN2A*



Il gene CDKN2A codifica per due proteine distinte, attraverso lo *splicing* alternativo di due diversi primi esoni (agli esoni 2 e 3 comuni). Il trascritto 1α codifica per l'oncosoppressore p16INK4, il trascritto 1β e per il prodotto alternativo p14ARF (*Alternative Reading Frame*). Le mutazioni a carico del gene *CDKN2A* alterano quindi le due principali vie di regolazione della proliferazione cellulare: quella di Rb e quella di p53.

Poiché in moltissimi casi con chiara aggregazione familiare non sono state identificate mutazioni nei geni ad alta penetranza noti (*CDKN2A/CDK4*), si ipotizza che altre mutazioni causali risiedano in regioni non tradotte, regioni introniche, nel promotore, comunque in zone regolatrici di tali geni.
Sino al 2009 erano state descritte solo 2 varianti causali di questo tipo, rispettivamente nel 5'UTR e nel secondo introne di p16 (8,9), mentre recentemente l'introduzione di nuovi saggi funzionali ha permesso di determinare l'impatto causale sulla traduzione di altre varianti del 5'UTR del gene p16, aprendo un nuovo approccio alla soluzione di questo problema (10).
Infatti, si stima che circa il 50% dei casi familiari di melanoma risulti, comunque, essere associato al locus 9p21. I recenti risultati di associazione genotipo-fenotipo GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) condotti su casi CDKN2A/CDK4 negativi rendono ipotizzabile che il locus 9p21 possa essere ancora coinvolto mediante complessi meccanismi di inattivazione dell'espressione genica rispetto a quelli precedentemente descritti o che un altro/i gene/i di suscettibilità sia presente in quello stesso locus (11).
Ad oggi, soltanto un nuovo locus ad alta suscettibilità è stato confermato, il locus 1p22 (12), ma all'interno di questo locus non è stato ancora identificato un gene specifico di suscettibilità da affiancare ai primi 2 già noti.

Le ipotesi per giustificare questa grossa difficoltà a colmare le conoscenze sui geni di predisposizione per famiglie ad alto rischio CDKN2A/CDK4 negative, nonostante i numerosi lavori di *linkage* e clonaggio posizionale, condotti nell'ambito dei laboratori della rete di eccellenza europea per la genetica del melanoma GenoMEL (www.genomel.org), possono essere cosi schematizzate:

- notevole eterogeneità genetica nella forma ereditaria di melanoma;
- presenza di rare mutazioni codificanti nei possibili geni candidati;
- presenza di meccanismi inattivanti non convenzionali nei possibili geni candidati;
- eredità poligenica e/o multifattoriale.

3.2 Consulenza e test genetico

Se da un lato si sta lavorando a definire un possibile modello di ereditarietà poligenica/multifattoriale, dall'altro si è recentemente provveduto ad allestire un percorso standardizzato per la consulenza e test genetico per la forma ereditaria autosomica dominante, che viene qui descritto. Tale percorso parte da un documento del Gruppo di Genetica Oncologica della Società Italiana di Genetica Umana (SIGU-ONC) (13), procede attraverso uno studio nazionale italiano con la collaborazione dell'IMI e si confronta con il documento di raccomandazioni internazionale elaborato nell'ambito di GenoMEL (5). In particolare, i primi studi relativi solo all'Italia settentrionale riportavano che la percentuale di famiglie *CDKN2A/CDK4* positive è pari al 30%, nelle famiglie con 2 affetti imparentati con relazione di primo grado, ed al 45% in quelle con 3 affetti (15,16). Da uno studio cooperativo nazionale dei principali Centri di genetica oncologica e per un totale di 204 famiglie è emerso che il 33% dei casi familiari è portatore di mutazione del gene maggiore di suscettibilità e che la frequenza di mutazione è correlata principalmente al numero di membri affetti, variando dal 25% delle famiglie con 2 al 72% di quelle con 4 o più membri affetti (14). In conclusione, i dati scientifici italiani e la revisione a livello internazionale dei dati di suscettibilità di genetica (vedi paragrafo successivo *Raccomandazioni per l'invio al test genetico - Una visione internazionale*) costituiscono la base di riferimento per definire alcuni principi generali per l'invio alla consulenza genetica ed eventualmente al test diagnostico.

Indicazioni per l'invio alla consulenza genetica oncologica per melanoma familiare

La proposta di iniziare un percorso di consulenza genetica oncologica per melanoma familiare, atta a valutare una situazione di rischio genetico, parte da medici di base, dermatologi, chirurghi plastici ed oncologi in presenza di una storia personale o familiare del paziente che rientri potenzialmente in uno o più dei seguenti criteri:

- 2 o più casi di melanoma nello stesso ramo della famiglia;
- mutazione nota in un gene predisponente (*CDKN2A*, *CDK4*);
- melanoma multiplo;
- sindrome del nevo displastico (o nevo atipico) e melanoma (nel paziente con DNS o nei familiari);

Per la popolazione italiana, sono state recentemente elaborate le curve di rischio relativo per le famiglie residenti in Liguria, il quale risulta essere circa 50 e 25 volte maggiore rispetto alla popolazione generale nei nuclei valutati a rischio genetico in cui sia rispettivamente presente o assente la mutazione nella zona codificante del gene *CDKN2A*. I dati ad oggi disponibili sulle famiglie italiane indicano che in presenza di ≥ 2 casi di melanoma distribuiti in due o tre generazioni si identifica mutazione nel 33% dei casi (16).

Contenuti e modalità della consulenza genetica oncologica e del test genetico

Colloquio iniziale (pre-test). Durante il primo colloquio al paziente vengono illustrati:

- gli aspetti genetici del melanoma familiare;
- l'utilità del test proposto ed i suoi limiti;
- una stima del rischio.

Nel corso di questa sessione viene elaborato l'albero genealogico (esteso per almeno 3 generazioni ed ai parenti di secondo grado di tutti i casi di melanoma riportati) insieme ai dati anagrafici ed anamnestici.
I casi di neoplasia, ed in particolare la diagnosi di melanoma, devono essere confermati dall'esame istologico; qualora non sia possibile per i casi deceduti si può cercare una conferma diagnostica dai dati derivanti dalle cartelle cliniche, dal certificato di morte o dal registro tumori.
L'anamnesi personale del probando viene raccolta con specifico riguardo ai fattori di rischio noti per melanoma (storia

dell'esposizione solare eccessiva e/o intermittente, forti scottature in età prepuberale, tendenza a sviluppare lentiggini solari e presenza di nevi atipici/displastici).
La presentazione della stima del rischio di melanoma deve includere informazioni anche riguardo alle incertezze ad essa collegate; in questo contesto, può essere utile far ricorso all'ausilio di materiale iconografico per illustrarla.
Per quanto concerne la presenza, in individui geneticamente predisposti, di un eventuale incremento di rischio per altre neoplasie, in particolare il carcinoma pancreatico esocrino, non sono ancora disponibili dati conclusivi ed a tutt'oggi costituisce ancora argomento attivo di ricerca e di dibattito.
L'obiettivo della consulenza genetica per il melanoma ereditario è, infatti, quello di aiutare i soggetti a rischio genetico a comprendere correttamente quali siano le opzioni attualmente disponibili ed a prendere le decisioni più adatte al proprio stile di vita ed alle proprie personali priorità, dopo essere stati adeguatamente informati.

Secondo colloquio. In questa fase, il paziente comunica la propria decisione di procedere o di interrompere il percorso, dopo avere rielaborato le informazioni ricevute nel primo colloquio.
Ciò può avvenire anche come prosecuzione immediata della prima sessione, se il paziente è in grado fornire durante il primo incontro le conferme diagnostiche necessarie.
Viene richiesto consenso informato scritto alla condivisione dei contenuti del primo colloquio, comprensivo anche delle indicazioni per il permesso di conservazione del campione dopo l'esecuzione del test e di utilizzazione futura per ulteriori test diagnostici e/o per scopi di ricerca.

Test diagnostico. Ove possibile, il test deve essere condotto inizialmente su un familiare affetto da melanoma. Il test inizia con l'analisi molecolare dei geni candidati (*CDKN2A*, *CDK4*) nel DNA estratto da sangue periferico. Nel gene *CDKN2A*, sono oggetto di analisi l'intera sequenza codificante (esoni 1alfa, 1beta, 2 e 3) insieme alle regioni delle giunzioni esone-introne, alla regione 5'UTR ed alle alterazioni genomiche causali note (8-10).

Nel gene *CDK4* è analizzato l'esone 2, nel quale sono localizzate le poche mutazioni ricorrenti ad oggi riscontrate. Per l'analisi di mutazioni puntiformi i metodi disponibili sono:

- sequenziamento diretto (*gold standard*);
- *screening* della zona codificante mediante DHPLC, considerato una valida alternativa (17).

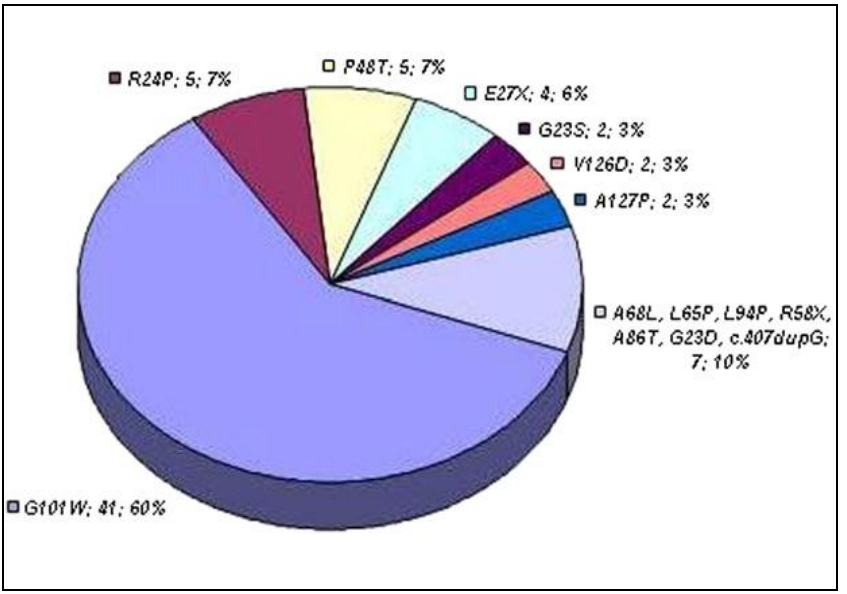
L'indagine molecolare può essere approfondita attraverso la ricerca di microdelezioni genomiche eventualmente presenti al locus 9p21 (tra il marcatore telomerico D9S736 e quello centromerico D9S171) con la metodologia MLPA, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*. Nel caso in cui sia identificata una mutazione, è possibile mettere a disposizione dei parenti del probando un test specifico di mutazione, che valuta la presenza nei singoli membri della famiglia di quel preciso difetto genetico.
Quando il significato della mutazione identificata nell'affetto rimane incerto (test dubbio), l'eventuale esecuzione del test genetico in altri membri della famiglia deve essere proposta al solo scopo di chiarire il ruolo biologico di quella mutazione e non come test di tipo predittivo.
Per valutare la patogenicità di mutazioni nella regione codificante, ed a significato incerto, esistono differenti test funzionali *in vitro* e semi *in vivo* basati sulle seguenti caratteristiche:

- la capacità di legame della proteina p16 mutata a CDK4/CDK6 *in vitro*;
- la capacità della proteina p16 mutata di inibire la crescita di colonie *in vitro*;
- la capacità di indurre la senescenza;
- la valutazione della localizzazione subcellulare della proteina mutata in fluorescenza.

Molto recentemente, questi saggi funzionali sono stati rivisti comparativamente ed è stato provato che la valutazione del legame alla CDK4 e della localizzazione subcellulare possono determinare accuratamente e velocemente il significato funzionale della mutazione *missense* (18).
La distribuzione delle mutazioni nelle famiglie italiane ad oggi accertata vede una vasta maggioranza di mutazioni *missense*, tra cui mutazioni ricorrenti di possibile o accertata origine comune (mutazioni fondatore) (14). Tale distribuzione non differisce dai dati

internazionali riportati da Goldstein et al. (6), sebbene il criterio adottato in tale valutazione fosse più stringente (≥ 3) (Figura 3).

Figura 3 Distribuzione delle mutazioni *missense* nella casistica italiana (14). Il numero e le frequenze sono indicate dopo il nome di ciascuna mutazione



Quando il test genetico non riscontra alcuna mutazione o la patogenicità della nuova mutazione non è ancora stata accertata, il test viene considerato non conclusivo per l'interpretazione della storia di quella famiglia, in cui non è possibile escludere la presenza di una mutazione genetica non identificabile dall'analisi attualmente disponibile (test non informativo).
Il test genetico predittivo per predisposizione al melanoma deve essere proposto solo a persone adulte, in grado di formulare un consenso consapevole (generalmente, si può considerare un'età non inferiore a quella legale dei 18 anni).

Terzo colloquio. Nel corso di questa sessione vengono discussi:

- il risultato del test;
- le modalità di prevenzione e sorveglianza appropriate.

Al momento del ritiro del referto è opportuno consegnare un documento schematico, che in generale, riassuma le modalità di prevenzione e sorveglianza, in soggetti con accertata predisposizione allo sviluppo di melanoma cutaneo, le quali, nel particolare, devono comunque essere concordate con il clinico di riferimento. Dopo la fase di valutazione del rischio, che include la risposta del test genetico, deve essere proposta al soggetto la possibilità di essere seguito nel tempo dall'équipe di consulenza genetica oncologica, anche nel caso di un risultato negativo dell'analisi molecolare.

Nelle fasi immediatamente successive alla comunicazione dell'esito del test genetico, è auspicabile che sia offerta la possibilità di un supporto psicologico e devono essere fornite le indicazioni sulle modalità di accesso alle strutture in grado di assicurare un'adeguata gestione delle attività cliniche previste dai programmi di prevenzione/riduzione del rischio.

Raccomandazioni per l'invio al test genetico - Una visione internazionale

Nel 2009, uno studio condotto da Lechman et al. (5) ha proposto una revisione della letteratura riguardante l'analisi mutazionale del gene *CDKN2A* in coorti di pazienti affetti da melanoma cutaneo invasivo, evidenziando la variabilità nel tasso di mutazione associata alla posizione geografica, all'origine etnica, al tipo di studio ed ai criteri di selezione utilizzati.

Oggetto dello studio era il valore predittivo di alcune caratteristiche tipiche delle sindromi di predisposizione al cancro, che si riscontrano anche nel melanoma ereditario (presenza di più membri affetti, presenza di tipi neoplastici associati a sindromi tumorali specifiche, sviluppo di neoplasie primarie multiple ed età d'esordio precoce) nell'identificazione delle famiglie portatrici di mutazione a carico dei geni di suscettibilità e che maggiormente potrebbero beneficiare dall'invio alla consulenza genetica.

Nonostante il tentativo di sintetizzare questi dati in Linee Guida applicabili a livello internazionale, la variabilità dell'incidenza e della penetranza delle mutazioni nelle diverse popolazioni sono tali che i clinici dovranno comunque tener conto della regione geografica e del

background genetico di ciascun paziente, quando ne valutano il rischio genetico.
Non essendo disponibili dati sufficienti ai fini della valutazione del rischio genetico, lo studio non ha preso ancora in considerazione il melanoma oculare.
La revisione internazionale dei criteri di selezione conclude che la variabilità dell'incidenza del melanoma e della penetranza delle mutazioni dei geni di suscettibilità è tale che è consigliabile che i clinici debbano seguire criteri adatti all'incidenza nella propria popolazione, riservandosi la possibilità di indirizzare alla consulenza pre-test anche i casi sporadici di melanoma multiplo.
Tra i punti principali messi in evidenza, anche meritevoli di approfondimenti futuri:

a) la presenza combinata di adenocarcinoma del pancreas e melanoma aumenta la probabilità di mutazioni in *CDKN2A*, anche se i tumori del pancreas sporadici e quelli familiari non sono predittivi di tale mutazione;
b) non ci sono dati sufficienti per determinare la probabilità di mutazione in soggetti con diagnosi di melanoma e adenocarcinoma pancreatico sincroni o metacroni, ma questo è un altro gruppo di pazienti per cui potrebbe avere una giustificazione l'invio in consulenza;
c) sebbene l'esordio precoce sia caratteristico dei soggetti portatori, in assenza di una storia familiare positiva, l'età d'esordio non é sufficientemente predittiva di mutazione e non giustifica in sé l'invio alla consulenza genetica, se non a scopo di ricerca;
d) il test genetico nei pazienti con nevi atipici e/o displastici, senza una storia familiare positiva per melanoma, non è giustificato sulla base dei dati attualmente disponibili.

In sintesi, lo studio propone che i candidati appropriati per la consulenza genetica siano selezionati in base a criteri distinti per Paesi ad alta e bassa incidenza (Tabella 1).

Tabella 1 Criteri per l'invio alla consulenza genetica secondo Leachamn et al. (5)

Paesi a bassa incidenza di melanoma	*Paesi a moderata/alta incidenza di melanoma*
• Soggetti con 2 (sincroni o metacroni) melanomi primari e/o	• Soggetti con 3 (sincroni o metacroni) melanomi primari e/o
• Famiglie con almeno 1 caso di melanoma invasivo ed una o più altre diagnosi di melanoma e/o tumori del pancreas in aggregazione tra parenti di primo o secondo grado dello stesso ramo familiare	• Famiglie con almeno 1 caso di melanoma invasivo e 2 o più altre diagnosi di melanoma invasivo e/o tumori del pancreas in aggregazione tra parenti di primo o secondo grado dello stesso ramo familiare

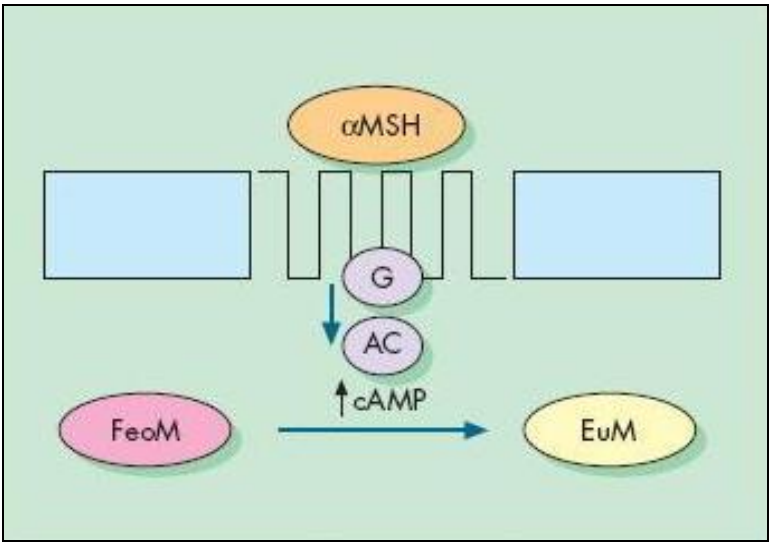
Si rende comunque necessario valutare l'applicabilità di questo modello internazionale alla specifica realtà italiana, supportando i criteri generali proposti con i risultati della caratterizzazione molecolare.

3.3 Prospettive future

Geni a bassa penetranza. Pensando al modello multifattoriale
Studi epidemiologici hanno correlato specifici tratti fenotipici, tra cui la cute chiara, gli occhi chiari e la scarsa capacità di abbronzarsi al rischio di sviluppare il melanoma (vedi cap. 1.0) e diversi studi di epidemiologia genetica hanno recentemente identificato un sottogruppo di geni correlati con la pigmentazione, che sono associati al rischio di sviluppare il melanoma. Più di 120 geni sono coinvolti nella regolazione della pigmentazione, tra essi il gene *MC1R* (*Melanocortin 1 Receptor*), che codifica per un recettore trans-membrana espresso in diversi tipi di cellule, inclusi melanociti e cheratinociti, e svolge un ruolo fondamentale nel controllo della pigmentazione, regolando, attraverso l'interazione con il ligando MSH (*Melanocyte Stimulating Hormone*), le percentuali relative di feomelanina (pigmento rosso) ed eumelanina (pigmento scuro), quest'ultima protettiva per le radiazioni UV (19) (Figura 4). È un gene altamente polimorfico, alcune varianti sono raggruppate sotto la sigla RHC (*Red Hair Color*), in quanto, se

presenti in omozigosità od eterozigosità composta, sono generalmente associate ad un foto-tipo di tipo 1.

Figura 4



Il gene *MC1R* (Melanocortin 1 Receptor) svolge il suo ruolo nel controllo della pigmentazione regolando, attraverso l'interazione con il ligando MSH (ormone stimolante i melanociti) ed una G *protein*, le percentuali relative di Feomelanina (FeoM) ed Eumelanina (EuM).

cAMP: adenosin-monofosfato ciclico.

Gli studi condotti su pazienti affetti da melanoma familiare con una stessa mutazione del gene maggiore di suscettibilità o con mutazioni diverse confermano che le varianti RHC possono modificare significativamente il rischio di melanoma.
Le cosiddette varianti non-RHC (NRHC) hanno scarsa o nulla correlazione col foto-tipo 1. Il loro contributo al rischio generale di melanoma è in fase di definizione. Il ruolo di *MC1R* nell'aumentare il rischio di melanoma si sta infatti definendo indipendente dal rischio associato con la pigmentazione. L'entità di questo impatto varia a

seconda della popolazione esaminata, anche per il diverso contributo di altri geni a bassa penetranza (20).
Per la valutazione del ruolo di altri geni della pigmentazione, che interagiscono con MC1R nel determinare un fenotipo a rischio di melanoma, sono stati condotti interessanti studi, ma la quantificazione di tale rischio è resa ancora più difficile proprio dal complesso modello di ereditarietà che si sta attualmente definendo.
Lo sviluppo di studi di associazione fenotipo-genotipo (GWAS) ha portato alla scoperta di polimorfismi di singoli nucleotidi (SNPs) o varianti genetiche dei geni coinvolti nella pigmentazione,TPCN2, ASIP, KITLG, NCKX5, TYR, IRF4, OCA2, e TYRP1 che conferiscono un basso-medio rischio di sviluppare melanoma oltre a confermare il ruolo di *MC1R* (21).
Recentemente, il sequenziamento dell'intero genoma in probandi di famiglie affette da melanoma, che non presentavano mutazioni dei geni *CDKN2A* e *CDK4*, ha consentito di identificare una nuova variante (E318K) di suscettibilità al melanoma a penetranza intermedia nel gene che codifica per il *Microphthalmia-associated Transcription Factor* (MITF) (22). Due studi caso-controllo, condotti nell'ambito di un'ampia popolazione australiana ed inglese, hanno inoltre confermato l'associazione della variante E318K con un aumentato rischio di sviluppare melanoma anche nella popolazione generale (22).
Questi risultati enfatizzano il contributo apportato dalle vie della pigmentazione alla predisposizione di sviluppare melanomi ed alla tumorigenesi attraverso complesse interazioni genetico-ambientali.

BIBLIOGRAFIA

1. Psaty EL, Scope A, Halpern AC, Marghoob AA. Defining the patient at high risk for melanoma. *Int J Dermatol 010 Apr; 49(4):362-76*
2. Hansson J. Familial cutaneous melanoma. *Adv Exp Med Biol 2010; 685:134-45*
3. Meyle KD, Guldberg P. Genetic risk factors for melanoma. *Hum Genet 2009 Oct; 126(4):499-510*
4. Demenais F, Mohamdi H, Chaudru V, Goldstein AM, Newton Bishop JA, Bishop DT, Kanetsky PA, Hayward NK, Gillanders E, Elder DE, Avril MF, Azizi E, van Belle P, Bergman W, Bianchi-Scarrà G, Bressac-de Paillerets B, Calista D, Carrera C, Hansson J, Harland M, Hogg D, Höiom V, Holland EA, Ingvar C, Landi MT, Lang JM,

Mackie RM, Mann GJ, Ming ME, Njauw CJ, Olsson H, Palmer J, Pastorino L, Puig S, Randerson-Moor J, Stark M, Tsao H, Tucker MA, van der Velden P, Yang XR, Gruis N. Melanoma Genetics Consortium. Association of MC1R variants and host phenotypeswith melanoma risk in CDKN2A mutation carriers: a GenoMEL study. *J Natl Cancer Inst 2010 Oct 20; 102(20):1568-83*

5. Leachman SA, Carucci J, Kohlmann W, Banks KC, Asgari MM, Bergman W, Bianchi-Scarrà G, Brentnall T, Bressac-de Paillerets B, Bruno W, Curiel-Lewandrowski C, de Snoo FA, Debniak T, Demierre MF, Elder D, Goldstein AM, Grant-Kels J, Halpern AC, Ingvar C, Kefford RF, Lang J, MacKie RM, Mann GJ, Mueller K, Newton-Bishop J, Olsson H, Petersen GM, Puig S, Rigel D, Swetter SM, Tucker MA, Yakobson E, Zitelli JA, Tsao H. Selection criteria for genetic assessment of patients with familial melanoma. *J Am Acad Dermatol 2009 Oct; 61(4):677. e1-14*
6. Goldstein AM, Chan M, Harland M, Hayward NK, Demenais F, Bishop DT, Azizi E, Bergman W, Bianchi-Scarra G, Bruno W, Calista D, Albright LA, Chaudru V, Chompret A, Cuellar F, Elder DE, Ghiorzo P, Gillanders EM, Gruis NA, Hansson J, Hogg D, Holland EA, Kanetsky PA, Kefford RF, Landi MT, Lang J, Leachman SA, MacKie RM, Magnusson V, Mann GJ, Bishop JN, Palmer JM, Puig S, Puig-Butille JA, Stark M, Tsao H, Tucker MA, Whitaker L, Yakobson E; Lund Melanoma Study Group; Melanoma Genetics Consortium (GenoMEL). Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet 2007 Feb; 44(2):99-106*
7. Goldstein AM, Chidambaram A, Halpern A et al. Rarity of CDK4 germline mutations in familial melanoma. *Melanoma Res 2002 Feb; 12(1):51-5*
8. Liu L, Dilworth D, Gao L, Monzon J, Summers A, Lassam N, Hogg D. Mutation of the CDKN2A 5' UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma. *Nat Genet 1999 Jan; 21(1):128-32*
9. Harland M, Taylor CF, Bass S et al. Intronic sequence variants of the CDKN2A gene in melanoma pedigrees. *Genes Chromosomes Cancer 2005 Jun; 43(2):128-36*
10. Bisio A, Nasti S, Jordan JJ, Gargiulo S, Pastorino L, Provenzani A, Quattrone A, Queirolo P, Bianchi-Scarrà G, Ghiorzo P, Inga A. Functional analysis of DKN2A/p16INK4a 5'-UTR variants predisposing to melanoma. *Hum Mol Genet 2010 Apr; 19(8):1479-91*
11. Bishop DT, Demenais F, Iles MM, Harland M, Taylor JC, Corda E, Randerson-Moor J, Aitken JF, Avril MF, Azizi E, Bakker B, Bianchi-Scarrà G, Bressac-de Paillerets B, Calista D, Cannon-Albright LA, Chin-A-Woeng T, Debniak T, Galore-Haskel G, Ghiorzo P, Gut I, Hansson J, Hocevar M, Höiom V, Hopper JL, Ingvar C, Kanetsky PA, Kefford RF, Landi MT, Lang J, Lubiński J, Mackie R, Malvehy J,

Mann GJ, Martin NG, Montgomery GW, van Nieuwpoort FA, Novakovic S, Olsson H, Puig S, Weiss M, van Workum W, Zelenika D, Brown KM, Goldstein AM, Gillanders EM, Boland A, Galan P, Elder DE, Gruis NA, Hayward NK, Lathrop GM, Barrett JH, Bishop JA. Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. *Nat Genet 2009 Aug; 41(8):920-5*

12. Gillanders E, Juo SH, Holland EA, Jones M, Nancarrow D, Freas-Lutz D, Sood R, Park N, Faruque M, Markey C, Kefford RF, Palmer J, Bergman W, Bishop DT, Tucker MA, Bressac-de Paillerets B, Hansson J, Stark M, Gruis N, Bishop JN, Goldstein AM, Bailey-Wilson JE, Mann GJ, Hayward N, Trent J; Lund Melanoma Study Group; Melanoma Genetics Consortium. Localization of a novel melanoma susceptibility locus to 1p22. *Am J Hum Genet 2003 Aug; 73(2):301-13*
13. SIGU-ONC (Sezione Linee guida, protocolli) *http://www.sigu.net/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=46&Itemid=91*
14. Bruno W, Ghiorzo P, Battistuzzi L, Ascierto PA, Barile M, Gargiulo S, Gensini F, Gliori S, Guida M, Lombardo M, Manoukian S, Menin C, Nasti S, Origone P, Pasini B, Pastorino L, Peissel B, Pizzichetta MA, Queirolo P, Rodolfo M, Romanini A, Scaini MC, Testori A, Tibiletti MG, Turchetti D, Leachman SA, Bianchi Scarrà G; IMI, Italian Melanoma Intergroup. Clinical genetic testing for familial melanoma in Italy: a cooperative study. *J Am Acad Dermatol 2009 Nov; 61(5):775-82*
15. Mantelli M, Barile M, Ciotti P, Ghiorzo P, Lantieri F, Pastorino L, Catricalà C, Torre GD, Folco U, Grammatico P, Padovani L, Pasini B, Rovini D, Queirolo P, Rainero ML, Santi PL, Sertoli RM, Goldstein AM, Bianchi-Scarrà G. Società Italiana Dermatologia; Gruppo Italiano Studi Epidemiologici in Dermatologia. High prevalence of the G101W germline mutation in the CDKN2A (P16(ink4a)) gene in 62 Italian malignant melanoma families. *Am J Med Genet 2002 Jan 22; 107(3):214-21*
16. Ghiorzo P, Gargiulo S, Pastorino L, Nasti S, Mantelli M, Bruno W, Sertoli MR, Genuardi M, Queirolo P, Bianchi Scarrà G. A novel melanoma-predisposing mutation, CDKN2A E27X, with a founder effect in Northern Italy. *The 6th World Congress on Melanoma, September 6-10, 2005, Vancouver, BC, Canada*
17. Harland M, Goldstein AM, Kukalizch K, Taylor C, Hogg D, Puig S, Badenas C, Gruis N, ter Huurne J, Bergman W, Hayward NK, Stark M, Tsao H, Tucker MA, Landi MT, Scarra GB, Ghiorzo P, Kanetsky PA, Elder D, Mann GJ, Holland EA, Bishop DT, Bishop JN; GenoMEL, the Melanoma Genetics Consortium. A comparison of CDKN2A mutation detection within the Melanoma Genetics Consortium (GenoMEL). *Eur J Cancer 2008 Jun; 44(9):1269-74*

18. McKenzie HA, Fung C, Becker TM, Irvine M, Mann GJ, Kefford RF, Rizos H. Predicting functional significance of cancer-associated p16(INK4a) mutations in CDKN2A. *Hum Mutat 2010 Jun; 31(6):692-701*
19. Raimondi S, Sera F, Gandini S, Iodice S, Caini S, Maisonneuve P, Fargnoli MC. MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer 2008 Jun 15; 122(12):2753-60*
20. Williams PF, Olsen CM, Hayward NK, Whiteman DC. Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: A meta-analysis and estimates of population burden. *Int J Cancer 2011 Oct; 129(7):1730-40*
21. Pho LN, Leachman SA. Genetics of pigmentation and melanoma predisposition. *G Ital Dermatol Venereol 2010 Feb; 145(1):37-45*
22. Yokoyama S et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature 2011 Nov 13;480(7375):99-103*

4.0 IMMUNOLOGIA

4.1 Caratteristiche di immunogenicità del melanoma cutaneo
4.2 Meccanismi di *priming* della risposta immunitaria anti-melanoma e ruolo delle cellule dendritiche
4.3 Repertorio antigenico delle cellule di melanoma
4.4 Meccanismi di *tumor immune escape* nel melanoma: ruolo delle cellule tumorali
4.5 Meccanismi di regolazione immunitaria negativa
4.6 *Signature* immunologica del melanoma

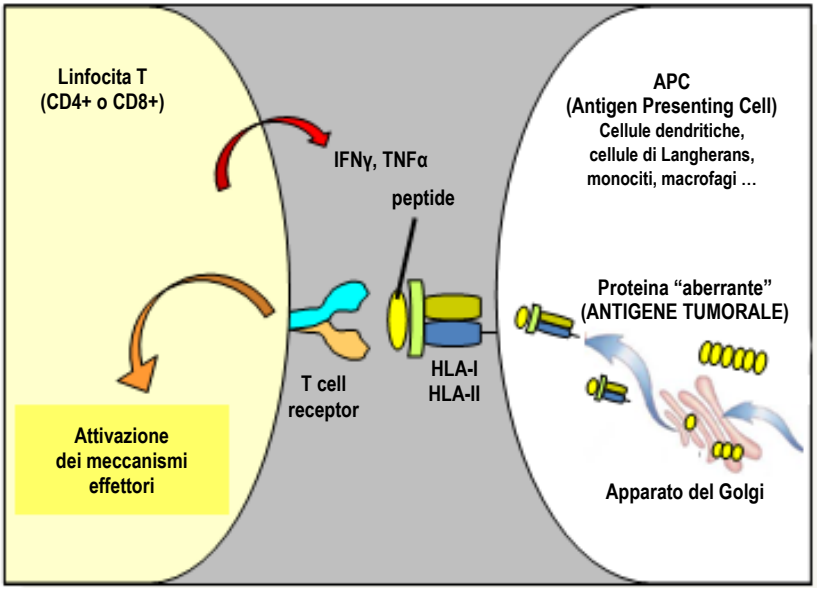
Il sistema immunitario è ormai riconosciuto come un elemento fondamentale nel controllo dello sviluppo tumorale. Infatti, la presenza di infiltrati immunitari con particolari caratteristiche di memoria immunologica rappresenta un fattore prognostico positivo in numerose neoplasie, mentre una manipolazione appropriata, attraverso terapie specifiche (vaccini anti-tumorali, anticorpi immunomodulanti, immunoterapia adottiva, ecc.), sta attualmente acquisendo un ruolo convincente nel trattamento di diversi tumori umani.
Il melanoma, che storicamente rappresenta uno dei primi tumori studiati in ambito immunologico, resta comunque la patologia in cui l'immunoterapia sta registrando il maggiore sviluppo. Di seguito, sono illustrati gli aspetti più innovativi degli ultimi anni di ricerca in merito allo studio delle interazioni tra sistema immunitario e melanoma, quali sono i meccanismi chiave di tali interazioni ed il razionale su cui si basano le strategie terapeutiche attualmente in sperimentazione clinica.

4.1 Caratteristiche di immunogenicità del melanoma cutaneo

La cute, che rappresenta la barriera più esposta del corpo umano, è sede di importanti meccanismi immunitari di tipo innato ed adattativo. Il sistema immunitario cutaneo è un complesso *network* di cellule di diverso tipo, che svolgono variegate funzioni di difesa. Infatti, nel derma papillare sono presenti linfociti T, monociti e cellule dendritiche, che insieme a mastociti, cellule di Langherans e cheratinociti sono pronti a rispondere in maniera efficiente alla

presenza di stimoli che alterino la costituzione e la funzione di questo tessuto.
Questi meccanismi di sorveglianza immunitaria sono principalmente adibiti a far sì che molecole espresse in maniera anomala, per fenomeni di infezione, infiammazione o trasformazione neoplastica, i cosiddetti antigeni, vengano fagocitati, processati e presentati dalle *antigen presenting cells* (come cellule dendritiche, cellule di Langherans, monociti e macrofagi) ai linfociti T specifici per quel determinato antigene. Da questa interazione vengono attivati ad "effettori", cioè in grado di distruggere cellule esprimenti l'antigene stesso (quali ad esempio le cellule tumorali) (Figura 1).

Figura 1 Presentazione antigenica da parte di *antigen presenting cell* ed attivazione di linfociti T antigene-specifici



Cellule dendritiche, in qualità di *antigen presenting cells*, fagocitano gli antigeni tumorali rilasciati da cellule in necrosi, li processano a livello del Golgi e li presentano in superficie come frammento peptidico legato alle molecole di HLA. L'interazione tra questo complesso ed il recettore delle cellule T (TCR) determina l'attivazione dei linfociti T e dei loro meccanismi effettori, rappresentati da molecole litiche e citochine infiammatorie.

Questo processo avviene nei linfonodi drenanti ed è alla base della significativa presenza di linfociti T tipicamente identificabili come infiltrato immunitario nelle lesioni di melanoma primitivo (1,2). Tale infiltrato, soprattutto quando caratterizzato da una distribuzione dei linfociti intra- e non peri-tumorale (secondo il noto *brisk infiltrate*), è stato associato ad una prognosi più favorevole della malattia (3,4), a riprova della funzione protettiva dell'immunità anti-tumorale. Nel melanoma umano sono stati effettuati ad oggi pochi studi di caratterizzazione di tale infiltrato immunitario (5) e le informazioni riguardanti l'infiltrazione di sottopopolazioni di linfociti T anti-tumorali (o effettori) rispetto a linfociti T di tipo immunoregolatorio o soppressorio (vedi in seguito) sono ancora scarse. Nonostante ciò, va sottolineato che in diverse altre neoplasie è ormai chiaro come la presenza di cellule immunitarie associate alla memoria immunologica possa rappresentare un fattore prognostico favorevole, a volte più potente dello stadio di malattia (6).

4.2 Meccanismi di *priming* della risposta immunitaria anti-melanoma e ruolo delle cellule dendritiche

Le cellule dendritiche (DC) sono una componente essenziale dell'immunità della cute. Difatti, un particolare sottogruppo di queste cellule, definite cellule di Langherans, localizzate nell'epidermide, sono considerate tra i più importanti attivatori dei linfociti T a livello cutaneo e nei linfonodi drenanti. Elementi di origine mieloide, le DC sono cellule dotate di grande plasticità, in grado di svolgere diverse funzioni immunitarie in base al loro stato di attivazione (1,7). Infatti, le DC immature (presenti come cellule di Langherans nello strato soprabasale dell'epidermide) sono adibite all'individuazione di patogeni o di elementi anomali presenti localmente. A tale scopo esercitano una marcata attività di fagocitosi e di processamento antigenico e mostrano un'elevata capacità migratoria, mentre esprimono bassi livelli di molecole co-stimolatorie quali HLA-classe II, CD80 e CD86. Al contatto con l'agente patogeno e fattori di infiammazione locali, le DC attivate acquisiscono l'espressione di recettori chemochimici, quali CCR7, che insieme alla secrezione di specifici fattori (tra cui le metalloproteinasi) permettono la migrazione delle DC ai linfonodi drenanti. Durante questo processo le cellule si differenziano a DC mature, ciò comporta l'aumentata espressione

di molecole co-stimolatorie e la capacità di secernere citochine di tipo pro-infiammatorio. Le DC mature sono potenti attivatori dei linfociti T, cui presentano l'antigene (derivato dal patogeno) come frammento peptidico espresso nel contesto di molecole HLA. Da tale interazione, *priming*, i linfociti T acquisiscono la capacità di proliferare, di migrare attraverso specifici *homing receptors* al sito di espressione antigenica, di riconoscere le cellule esprimenti l'antigene e di eliminarle mediante rilascio di sostanze citolitiche quali *Perforin* e *Granzyme B*. Successivamente, i linfociti T entrano in una fase di riposo e, localizzandosi nei linfonodi drenanti, vanno a costituire un *pool* di cellule *memory*, pronte ad una nuova attivazione in caso la noxa patogena dovesse ripresentarsi (*risposta immunitaria secondaria*).
Nei pazienti con melanoma, la fase di *priming* dei linfociti T tumore-specifici che troviamo infiltranti le lesioni primitive avviene secondo il processo sopradescritto (8). Nella maggior parte dei casi, i trattamenti basati sull'attivazione del sistema immunitario (quali ad esempio i vaccini anti-tumore) coinvolgono invece la riattivazione e l'espansione delle risposte immunitarie di tipo *memory*.

4.3 Repertorio antigenico delle cellule di melanoma

Oltre all'elevata attività immunologica della cute, la marcata immunogenicità del melanoma è attribuita al ricco repertorio di proteine antigeniche espresse da queste cellule tumorali. Infatti, le cellule di melanoma esprimono diverse macromolecole in grado di essere riconosciute dai linfociti T in maniera HLA-ristretta. Come brevemente indicato nella Tabella 1, il melanoma esprime antigeni comuni ed antigeni unici (2,9) (vedi sottocap. 11.3). I primi sono presenti, con frequenze diverse, in cellule di melanoma di pazienti diversi, mentre gli antigeni unici, derivando da mutazioni puntiformi che avvengono a livello del DNA delle cellule tumorali a causa dell'elevata instabilità genetica e che subentrano spesso in geni coinvolti nei processi di trasformazione neoplastica (oncosoppressori, oncogeni, proteine del ciclo cellulare, ecc.), sono specifici dei singoli pazienti. Questa categoria antigenica, pur mostrando un'elevata selettività nonché una maggior potenza in termini immunologici, non è di particolare interesse dal punto dei vaccini anti-tumorali, essendo specifica dei singoli individui. Invece, investe un potenziale interesse a fronte di trattamenti basati su cellule o

proteine tumorali autologhe (ovvero derivate dal paziente stesso), quali ad esempio le proteine dello *shock* termico HSP (*Heat Shock Proteins*) o in corso di terapia con anticorpi immunomodulanti, come anti-CTLA4 e PD1, che potenziando in maniera aspecifica la risposta T mediata, determinano un'espansione dei linfociti tumore specifici, inclusi quelli diretti verso antigeni unici (10).
Tra gli antigeni comuni a melanomi sviluppatisi in pazienti diversi, troviamo diverse categorie (Tabella 1).

Tabella 1 Repertorio antigenico espresso da cellule di melanoma e *pattern* di espressione dei diversi antigeni

Categoria antigenica	Pattern di espressione		Esempi
	Melanoma	Cellule normali	
Antigeni comuni, di differenziazione (melanogenesi)		 melanociti	MelanA/Mart-1, gp100, TRP2, tyrosinase
Antigeni comuni, legati alla trasformazione neoplastica			Survivin, mutBRAF
Antigeni comuni, di derivazione embrionale (cancer/testis Ag)			MAGE, NY-Eso1, PRAME
Antigeni individuali, legati a mutazioni uniche			βcatenin, CDK4

I più rappresentati, come livello di espressione nel singolo tumore e come frequenza in diversi casi, sono gli antigeni di differenziazione, che rappresentano un complesso *network* di proteine coinvolte nei processi di melanogenesi. Questi antigeni, quali MelanA-Mart-1 e gp100 (o HMB45), sono iperespressi in cellule di melanoma rispetto a melanociti normali, che pur sono positivi, e rappresentano ormai un marcatore di diagnosi istopatologica di questa patologia. Trattandosi di proteine normali, non è chiaro come possano venire così efficacemente riconosciute dal sistema immunitario, come dimostrato dall'elevata frequenza di linfociti T CD8+ specifici

per questi antigeni identificabili nel sito tumorale e nel sangue periferico di pazienti affetti da melanoma. Si ipotizza che l'elevata immunogenicità della cute, insieme a fenomeni di superamento della tolleranza immunologica, siano alla base di questo fenomeno. L'elevata espressione degli antigeni di differenziazione ha sostenuto un grande studio della risposta immunologica diretta verso queste molecole e, conseguentemente, un'elevata applicazione clinica in studi sperimentali di vaccinazione anti-tumorale. Va però riconosciuto che l'efficacia terapeutica di vaccini diretti verso questi antigeni è piuttosto limitata, probabilmente a causa del controllo della tolleranza immunologica verso proteine *self* (2).
Un'altra famiglia di antigeni comuni è costituta da proteine la cui espressione viene selettivamente up-regolata nelle cellule tumorali. Si tratta o di molecole associate alla trasformazione neoplastica, come survivina, telomerasi, mutBRAF, o di origine embrionale, silenziate in cellule adulte, ma riespresse in cellule tumorali in seguito a fenomeni di demetilazione. Di quest'ultima categoria fanno parte gli antigeni del gruppo CT (*Cancer-Testis*) (così denominati per l'espressione selettiva in tumore, cellule del Sertoli e placenta), che stanno acquisendo una notevole importanza nell'ambito dei trattamenti vaccinali del melanoma (11). Difatti, studi pre-clinici hanno mostrato che antigeni CT, quali MAGE3 e NY-ESO-1, sono in grado di attivare linfociti T CD8+ ad elevata affinità, quindi con una marcata capacità di eliminazione delle cellule tumorali che esprimono questi antigeni (12). Studi clinici di fase I-II hanno poi dimostrato che tali risposte immunitarie, indotte *in vivo* mediante vaccinazione con proteine MAGE3 o NY-ESO-1 ricombinanti, esercitano un controllo della malattia in pazienti con melanoma metastatico resistente ai trattamenti convenzionali, con notevoli benefici in termini di sopravvivenza (13). Tali risultati hanno portato ad un'accelerazione dello sviluppo clinico di questi approcci vaccinali, che sono attualmente in valutazione come trattamento adiuvante (studio DERMA) nella prevenzione delle recidive in pazienti in stadio II-III, e terapeutico, in soggetti affetti da malattia in stadio IIIC e IV.
E' stato recentemente dimostrato che gli antigeni CT, soprattutto quelli della famiglia MAGE, sono in realtà molecole coinvolte in *pathway* di proliferazione e sopravvivenza delle cellule di melanoma e che la loro espressione è associata ad una malattia più aggressiva. Infatti, è stato riportato come la positività per MAGE-A1, MAGE-A4 ed NY-ESO-1 nel melanoma primitivo rappresenta un fattore

prognostico indipendente (14), mentre l'espressione di MAGE-C1 e C2 è un potenziale fattore predittivo di metastasi linfonodali (15). L'identificazione di vaccini anti-tumorali efficaci nell'attivare risposte immunitarie contro questi antigeni risulta quindi cruciale per il trattamento dei melanomi più aggressivi ed a peggior prognosi.

4.4 Meccanismi di *tumor immune escape* nel melanoma: ruolo delle cellule tumorali

Se è chiaro che una reazione immunitaria efficiente possa rappresentare un fattore protettivo nei confronti della crescita neoplastica, è anche altrettanto chiaro come il tumore sia precocemente in grado di superare queste difese, attraverso una serie di meccanismi definiti globalmente come *tumor immune escape*. Infatti, sia il tumore sia il microambiente dell'ospite tendono, con il progredire della malattia, a creare condizioni sempre più sfavorevoli alla sopravvivenza ed all'attività dei linfociti T tumore-specifici (16). Come esemplificato nella Tabella 2, che riporta un sommario dei più salienti *pathway* di *immune escape* descritti nel melanoma umano, tali meccanismi possono essere esercitati direttamente dal tumore oppure mediati da cellule immunitarie difettive/immunosoppressorie reclutate dal tumore o da fenomeni di infiammazione cronica.

Tabella 2 Principali meccanismi responsabili dell'inefficienza della risposta immunitaria anti-tumore

Melanoma	Sistema immunitario
Perdita dell'espressione di determinanti antigenici - Perdita di antigeni - Perdita di molecole HLA - Difetti nel processamento dell'antigene	Difetti funzionali della risposta immunitaria - Cellule dendritiche immature o disfunzionali - Linfociti T a bassa affinità per l'antigene - linfociti difettivi per funzioni effettrici
Rilascio di fattori immunosoppressivi e protumorigenici (TGFβ, IL-10, etc.)	Accumulo di cellule T regolatorie ad azione immunosoppressiva
Rilascio di MICROVESCICOLE o EXOSOMI TUMORALI con azione pro-apoptotica sui linfociti T attivati ed immunomodulatoria negativa	Accumulo di cellule di origine mieloide ad azione immunosoppressiva - Myleoid-derived suppressor cells - Macrofagi M2 - Neutrofili N2
Alterazioni metaboliche del microambiente tumorale	Alterazioni tolerogeniche del microambiente tumorale (infiammazione cronica)

Per quanto riguarda il tumore, uno dei primi livelli di *immune escape* è rappresentato dalla perdita di espressione del complesso antigene/HLA, che rappresenta il determinante riconosciuto dai linfociti T attraverso il TCR (*T Cell Receptor*). Come probabile risultato di processi di immunoselezione mediati dagli stessi linfociti CD8+ anti-tumore, le cellule di melanoma possono infatti perdere *in vivo* l'espressione delle molecole di HLA-classe I o dell'antigene tumorale, divenendo perciò "invisibili" alle cellule T. Tali perdite possono essere parziali ed interessare singoli loci (per cui le cellule risulteranno negative solo per determinati alleli HLA-A, B o C) oppure totali, come ad esempio nel caso di mutazioni a carico della β2-microglobulina (una proteina strutturale indispensabile per la formazione della molecola di HLA), con conseguente perdita totale di espressione HLA (17,18). Inoltre, i difetti di espressione dell'HLA possono essere conseguenti a mutazione, e quindi risultare definitivi, o dovuti a down-modulazione funzionale, quindi recuperabile attraverso l'esposizione a fattori modulatori quali ad esempio, l'interferone (19).
Per quanto la perdita di HLA ed antigene sia stata riportata avvenire *in vivo*, specialmente in pazienti sottoposti ad immunoterapia (20), non esiste in realtà evidenza certa che questo meccanismo giochi

un ruolo cruciale nel *tumor immune-escape* in pazienti con melanoma, soprattutto nelle fasi iniziali della malattia (21). La modulazione dell'HLA come meccanismo di *immune-escape* può includere inoltre l'acquisizione di espressione di molecole HLA "non classiche" (ad esempio, HLA-G), che potrebbero inibire l'attività anti-tumorale di cellule NK, attraverso l'inibizione della loro attività citotossica (22). Va però menzionato che il ruolo di questa via molecolare nel processo di evasione imunologica delle cellule di melanoma è attualmente ancora controverso e necessita di ulteriori approfondimenti, soprattutto a livello clinico (23).

Le cellule di melanoma, come tutte le cellule neoplastiche, sono in grado di secernere un ampio spettro di molecole immunosoppressorie, incluse citochine pro-infiammatorie (ad esempio Interleuchina 1β, 6 e 8) legate al *pathway* di NFkappaB, ed immunosoppressive (quali TGF-β), chemochine (quali CCL2, CCL3, CXCL9) e fattori in grado di modulare l'attività emopoietica del midollo (24,25). Inoltre, acquisiscono l'espressione di fattori enzimatici, anch'essi pro-infiammatori, come ad esempio COX-2, una delle molecole coinvolte nel *pathway* di sintesi delle prostaglandine (26). Conseguentemente, il microambiente in cui le cellule di melanoma si sviluppano viene progressivamente ad arricchirsi di fattori che, favorendo la crescita del tumore grazie a processi di infiammazione cronica e di neoangiogenesi, tendono al contrario a spegnere la risposta immunitaria T specifica.

Oltre ad un effetto di immunosoppressione al sito tumorale, i fattori rilasciati possono contribuire a condizionare negativamente anche i linfonodi drenanti, bloccando in essi i processi di *priming* della risposta T. Infatti, le cellule tumorali sono in grado d'influenzare il sistema immunitario dell'ospite anche senza la necessità di un contatto cellula-cellula, grazie cioè al rilascio di fattori solubili ed attraverso la produzione di strutture vescicolari di dimensioni nanometriche, note come exosomi. Queste microvescicole, che originano dagli endosomi e che fanno parte dei meccanismi fisiologici di *cross-talk* intercellulare (27), rappresentano delle repliche in scala ridotta delle cellule che li sercernono, quindi esprimono un ampio repertorio di proteine (derivate dalla membrana, dal citoplasma e dal compartimento endosomale), acidi nucleici (DNA, RNA, microRNA) e lipidi. La produzione di exosomi, che nei tumori risulta amplificata e deregolata rispetto alle cellule normali (26), è evidenziabile anche

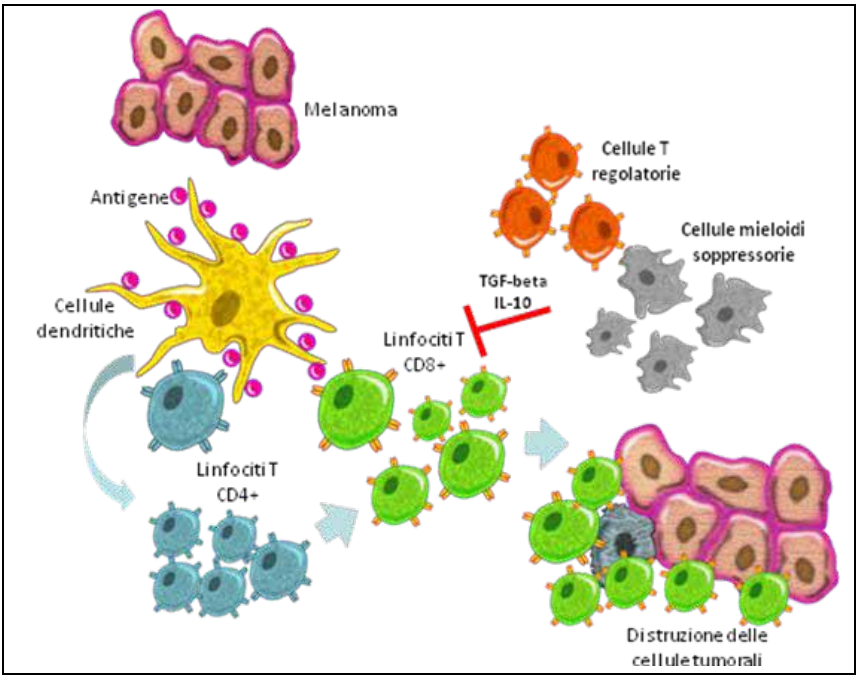
in vivo, come dimostrato dall'isolamento di exosomi di origine tumorale nei fluidi corporei (sangue, urine, essudati) di pazienti affetti da neoplasia, soprattutto se in stadio avanzato.
Negli ultimi anni, si sono accumulate numerose evidenze riguardo al ruolo immunosoppressorio di queste vescicole, che coinvolge diverse sottopopolazioni della risposta immune e diversi meccanismi, tra cui l'induzione di apoptosi dei linfociti T attivati e la generazione di cellule mieloidi soppressorie (28). Va sottolineato che, oltre ad essere coinvolti nei processi di interazione tra tumore ed ospite, gli exosomi tumorali sono attualmente in studio come possibile marcatore sistemico di malattia minima o residua, grazie alla loro espressione di antigeni (ad esempio, Mart-1, gp110, Caveolina, ecc.) (29) o di profili microRNA tumore-specifici (30).
Un altro aspetto che sta chiaramente emergendo in merito al microambiente tumorale ed ai meccanismi di *immune escape* è legato alle alterazioni metaboliche che subentrano a livello della lesione neoplastica e dei tessuti limitrofi. Queste alterazioni, che sembrano subentrare precocemente in associazione con mutazioni di geni come *BRAF* e *RAS*, portano ad un anormale metabolismo del glucosio (31) e ad un progressivo cambiamento delle caratteristiche chimico-fisiche del microambiente. Ciò è associato, tra l'altro, ad un progressivo ed importante cambiamento del pH, che in melanomi sperimentali raggiunge valori < 6,5 (32). L'acidità è sicuramente una delle condizioni più sfavorevoli per la funzionalità delle cellule immunitarie e può quindi contribuire a fare della lesione tumorale un ambiente difficilmente accessibile alle cellule dell'ospite. Una recente linea di ricerca è quindi volta a comprendere quanto una correzione selettiva dei livelli di pH delle lesioni tumorali possa rappresentare un valido approccio per controllare la crescita del tumore e ripristinare le normali risposte di difesa.

4.5 Meccanismi di regolazione immunitaria negativa

L'omeostasi del sistema immunitario comprende, come atteso, meccanismi di regolazione negativa, che limitano l'intensità e la durata delle risposte in modo da evitare reazioni autoimmuni e controllare i fenomeni di infiammazione cronica. A causa di una stimolazione antigenica continuativa ed alla produzione di sostanze pro-infiammatorie, questi meccanismi vengono amplificati nei pazienti affetti

da melanoma, così come nella maggior parte delle altre neoplasie, con importanti conseguenze sulla risposta immunitaria anti-tumore. Tra i principali *pathway* regolatori troviamo le cellule T regolatorie (Treg) e le cellule mieloidi soppressorie (MDSC) (Figura 2).

Figura 2 Meccanismi immunoregolatori negativi mediati da Treg e MDSC nel melanoma



Le cellule di melanoma, rilasciando antigeni, promuovono l'attivazione delle cellule dendritiche, che a loro volta inducono il *priming* di linfociti T tumore-specifici. Tale processo, a livello di interazione DC/linfociti T e linfociti T/tumore, viene antagonizzato da cellule modulatorie negative, quali le cellule T regolatorie e le cellule mieloidi soppressorie.

Le prime sono cellule T $CD4^+$ di origine timica, identificabili in modelli murini per l'espressione di elevati livelli del recettore ad alta affinità per IL-2 (CD25) ed il fattore trascrizionale Foxp3. Nell'uomo, il fenotipo $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ è meno specifico di cellule

regolatorie, essendo condiviso anche da cellule di tipo effettore. Le cellule Treg si differenziano come tali nel timo, ma si generano anche a livello del sito tumorale tramite la conversione di linfociti $CD4^+$ ad opera di vari fattori secreti dal tumore, quali ad esempio il TGFβ. I meccanismi utilizzati dalle Treg per sopprimere la risposta T anti-tumore sono complessi e non ancora completamente delucidati, soprattutto a livello delle neoplasie umane. Oltre infatti a bloccare la funzione effettrice delle cellule T $CD8^+$, le Treg competono con queste ultime per il legame con le DC, interferendo quindi con i processi di *priming* della risposta immunitaria (33).
In pazienti neoplastici, le Treg sembrano essere in grado di inibire selettivamente la reattività immunitaria anti-tumorale, senza quindi intaccare altri tipi di risposte, attraverso lo stesso riconoscimento antigenico che regola i linfociti T effettori. Infatti, Treg specifiche per antigeni tumorali sono state recentemente identificate in modelli pre-clinici murini ed in pazienti neoplastici (34). La frequenza di Treg circolanti risulta maggiore nei pazienti affetti da melanoma, ma solo in fase avanzata (stadio IV), mentre in stadi più precoci, il numero di queste cellule nel sangue periferico risulta sovrapponibile a quello identificabile in soggetti sani, indicando che l'accumulo di queste cellule a livello sistemico potrebbe essere associato al carico tumorale. Va inoltre sottolineato che, in pazienti con melanoma sottoposti a vaccinazione anti-tumore, la deplezione, anche se temporanea, delle cellule Treg mediante somministrazione di basse dosi di Ciclofosfamide, un trattamento efficace nel potenziare l'immunità tumorale mediante eliminazione di queste cellule soppressorie in modelli murini, non si associa ad un aumento della risposta immunitaria o clinica (35).
Cellule $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ sono identificabili anche nel microambiente tumorale, come in lesioni di melanoma primitive e nei linfonodi drenanti. Quanto questo tipo di infiltrato abbia un impatto negativo sulla risposta immunitaria T-mediata non è attualmente ancora chiaro in questa patologia, al contrario di altri tumori solidi, quali ad esempio il carcinoma del colon o della mammella, in cui la presenza di Treg a livello della lesione neoplastica si associa ad una prognosi negativa (36). È possibile che sia necessario identificare marcatori più specifici di queste cellule, associati ad una reale attività immunosoppressiva, al fine di valutare quale ruolo le Treg giochino nello sviluppo e nella progressione del melanoma. Ad esempio, è stato recentemente dimostrato che

cellule $CD4^{+}CD25^{high}Foxp3^{+}$ positive per il marker Lag3 si accumulano a livello delle lesioni di melanoma ed in linfonodi metastatici rispetto a linfonodi negativi (37), a supporto dell'ipotesi che sia richiesto un determinato stato di attivazione perché le cellule Treg svolgano la propria azione regolatoria.

Un'altra popolazione coinvolta nel controllo delle risposte immunitarie e dei fenomeni di infiammazione è costituita dalle cellule MDSC (Figura 2). In corso di processi flogistici sia acuti sia cronici, precursori emopoietici immaturi vengono mobilizzati dal midollo ed attratti al sito patologico tramite la presenza di specifici fattori chemotattici.

Tali elementi hanno la funzione fisiologica di controllare la risposta immunitaria, evitando reattività incontrollate e facilitando la risoluzione dell'evento (38). Nei tumori, come in molti casi d'infiammazione cronica, elementi midollari fenotipicamente e funzionalmente alterati si accumulano a livello locale e sistemico, svolgendo, analogamente alle Treg, un effetto inibitorio sull'immunità specifica, in particolare sui linfociti T effettori $CD8^{+}$. Anche in merito a queste cellule esistono significative differenze tra i modelli murini ed i pazienti neoplastici. Difatti, mentre nei topi portatori di tumori le MDSC sono rappresentate da cellule mieloidi co-esprimenti marcatori granulocitari e monocitari e fenotipo $CD11b^{+}GR1^{+}$ (39), nell'uomo tali caratteristiche sembrano attualmente diversificarsi nei differenti istotipi tumorali (Tabella 3).

Tabella 3 Caratteristiche fenotipiche e funzionali delle MDSC descritte nei diversi tumori umani

Istotipo tumorale	*Fenotipo MDSC*	*Meccanismi di immunosoppressione*	*Referenze*
Carcinoma renale	- $CD11b^+$ $CD14^-$ $CD15^+$ - $Lin^-HLA\text{-}DR^-$ $CD33^+$ - $CD11b^+$ $CD14^-$ $CD15^+$ $CD66b^+$ $VEGFR1^+$	- ARG1/iNOS - ROS e NO - ARG1	- Zea AH, et al. *Cancer Res '05* - Kusmartsev S, et al. *Clin Cancer Res '08* - Rodriguez PC, et al. *Cancer Res '09*
NSCLC	- $CD11b^+$ $CD14^-$ $CD15^+$ $CD33^+$	- ARG1/iNOS	- Liu CY, et al. *J Cancer Res Clin Oncol '09*
Melanoma e carcinoma colon	- $CD15^+$ $CD124(IL4R\alpha)^+$ $CD14^+$ $CD124(IL4R\alpha)^+$	Non determinato	- Mandruzzato S, et al. *J Immunol '09*
HNSCC, NSCLC, carcinoma mammella	- $Lin^-HLA\text{-}DR^-$ - $CD34^+$ $CD11b^+$	Non determinato	- Almand B, et al. *J Immunol '01*
Mieloma multiplo, HNSCC	- $CD14^+$	- ARG1/iNOS	- Serafini P, et al. *J Exp Med '06*
Melanoma	- $CD14^+$ $HLA\text{-}DR^{-/lo}$	- TGFβ	- Filipazzi P, et al. *J Clin Oncol '07*
IBD	- $CD14^+$ $HLA\text{-}DR^-$	- ARG1	- Haile LA, et al. *Gastroenterology '08*
HCC	- $CD14^+$ $HLA\text{-}DR^-$	- ARG1 ed espansione Treg	- Hoechst B, et al. *Gastroenterology '08*
Carcinoma prostata	- $CD14^+$ $HLA\text{-}DR^-$	- IL10	- Vuk-Pavlovic S, et al. *Prostate '09*
T-Cell NHL	- $CD14^+$ $HLA\text{-}DR^-$ $B7\text{-}H1^+$	- Espansione Treg	- Wilcox RA, et al. *Blood '09*

NSCLC: Non-Small-Cell Lung Carcinoma
HNSCC: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
IBD: Inflammatory Bowel Disease
HCC: Hepatocellular Carcinoma
T-Cell NHL: T-cell Non-Hodgkin's Lymphoma
ARG1:Arginase 1; iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase; IL: Interleukin;
TGFβ: Transforming Growth Factorβ

Nei pazienti con melanoma è stata identificata una popolazione di monociti immaturi, caratterizzati dal fenotipo $CD14^+HLA\text{-}DR^{neg}$, che inibiscono la proliferazione e la capacità di secernere granuli litici e citochine nei linfociti T $CD8^+$ attraverso il rilascio di TGFβ (39). Tali MDSC sono presenti in frequenza superiore nel sangue periferico di pazienti affetti da melanoma rispetto a donatori sani, a partire

da stadi molto iniziali (stadio II-III) di malattia, suggerendo un coinvolgimento precoce di questi meccanismi di immunosoppressione nella progressione di questa neoplasia. Un'elevata frequenza di MDSC è associata ad una ridotta responsività al trattamento con vaccini anti-tumorali, a dimostrazione del ruolo negativo che queste cellule svolgono nella risposta immunitaria. Monociti a probabile azione immunosoppressoria e pro-tumorigenica sono identificabili anche a livello del sito tumorale (nei melanomi primitivi), in cui una maggior infiltrazione di cellule positive per CD14 e CD68 è fattore prognostico negativo indipendente (40).
Il precoce reclutamento di MDSC è presumibilmente legato alla provata capacità delle cellule di melanoma di secernere fattori in grado di modulare il differenziamento di quelle di origine mieloide a livello locale o sistemico, quali G-CSF e GM-CSF ed altri, che favoriscono l'attivazione di cellule con capacità immunosoppressive e pro-tumorigeniche. Dati *in vitro* dimostrano infatti come l'incubazione di monociti normali con supernatante od exosomi derivati dal melanoma porta ad un'alterazione del differenziamento ed una modulazione verso cellule con fenotipo MDSC (28).
L'importanza delle MDSC nella progressione di questo tumore è inoltre sottolineata dalla capacità di queste cellule di svolgere diverse funzioni che favoriscono la crescita neoplastica. Infatti, a differenza delle Treg, l'azione negativa delle MDSC non si limita all'attività immunosoppressiva, ma include una marcata capacità di sostenere la neoangiogenesi, mediante la produzione di VEGF ed altri fattori relati, nonché di favorire il rimodellamento dello stroma e la metastatizzazione attraverso il rilascio di TGFβ.
Come è stato esposto, diverse componenti presenti nel microambiente tumorale di lesioni di melanoma sono potenzialmente responsabili di un blocco della risposta immunitaria anti-tumore. Queste componenti, insieme alle cellule neoplastiche stesse, utilizzano meccanismi molecolari definiti, che possono quindi rappresentare nuovi *target* terapeutici. Infatti, anticorpi immunomodulanti come l'anti-CTLA4 e l'anti-PD1 agiscono presumibilmente attraverso il blocco di questi controlli regolatori negativi della risposta immunitaria. Inoltre, farmaci in grado di interferire con il differenziamento delle MDSC o con i meccanismi soppressori utilizzati da queste cellule, tra cui IDO e TGFβ, potrebbero risultare estremamente promettenti nell'identificazione di strategie terapeutiche in grado di controllare questa malattia.

4.6 *Signature* immunologica del melanoma

Al fine di comprendere le caratteristiche di un'efficiente risposta immunitaria anti-tumore e di identificare possibili fattori predittivi di sensibilità al controllo immunologico, numerosi studi di analisi dell'espressione genica sono stati effettuati negli ultimi anni su lesioni di melanoma metastatico, in relazione alla risposta dei pazienti a trattamenti di tipo immunoterapeutico o alla prognosi. Almeno 3 studi indipendenti hanno mostrato come l'espressione nel microambiente tumorale di una particolare *signature* immuno-relata predisponga ad una maggior sensibilità ai vaccini anti-tumorali e ad un decorso di malattia meno aggressivo (41). Per quanto non ci sia una totale sovrapposizione degli specifici geni identificati nei diversi studi, come d'altronde atteso, sono state comunque identificate delle importanti similitudini, con una comune up-regolazione di geni implicati nella funzione dei linfociti T, nella sintesi di chemochine coinvolte nel reclutamento delle cellule T effettrici e nella risposta immunitaria innata.
Alcuni dei geni coinvolti nella *signature* immuno-relata riguardano fattori nella regolazione della migrazione delle cellule T al sito tumorale, come ad esempio le chemochine CCL3, CCL4, CCL5, CCL9 e CXCL10 od i corrispettivi recettori espressi sulle cellule T. Ciò indica che la capacità delle cellule di melanoma di attrarre linfociti T effettori al sito tumorale può rappresentare un fattore prognostico positivo.
Studi prospettici sono attualmente in corso per validare questa *signature* immunologica e per verificare se possa davvero identificare un sottogruppo di pazienti di melanoma, in cui una manipolazione del sistema immunitario possa risultare vincente in termini di strategie terapeutiche.
In conclusione, il ruolo cruciale del sistema immunitario nel controllo della malattia in pazienti con melanoma è ormai definitivamente assodato. Nell'ultimo decennio sono stati compiuti straordinari passi nello studio delle interazioni che intercorrono tra cellule tumorali e risposte immunitarie, i diversi *pathway* molecolari che regolano tali interazioni ed i potenziali bersagli terapeutici ad essi associati. Questa estesa mole di informazioni ha permesso un più convinto e concreto sviluppo clinico dei trattamenti basati sulla manipolazione del sistema immunitario, a partire dagli importanti successi recentemente riportati grazie ad anticorpi immunomodulanti quali

anti-CTLA4 ed anti-PD1, fino ai vaccini anti-tumorali, attualmente in studio nel *setting* adiuvante (42).
Se sono piuttosto chiare quali possano essere le strategie più promettenti per attivare in maniera specifica l'immunità T-mediata, restano però ancora da acquisire cruciali informazioni in merito a come contrastare i complessi e plurimi meccanismi d'immunosoppressione, che caratterizzano il microambiente del melanoma sin dalle prime fasi di sviluppo della malattia. É quindi auspicabile che uno sforzo specifico venga compiuto per comprendere quali interventi farmacologici possano antagonizzare questi meccanismi, al fine di poter disegnare trattamenti di combinazione, che permettano un controllo efficace e duraturo della malattia da parte del sistema immunitario.

BIBLIOGRAFIA

1. Speeckaert R, van Geel N, Vermaelen KV, Lambert J, Van Gele M, Speeckaert MM, Brochez L. *Immune reactions in benign and malignant melanocytic lesions: lessons for immunotherapy. Pigment Cell Melanoma Res 2011 Apr; 24(2):334-44. doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00799.x. Epub 2010 Nov 19*
2. Parmiani G, Castelli C, Santinami M, Rivoltini L. Melanoma immunology: Past, present and future. *Curr Opin Oncol 2007; 19(2):121-7*
3. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC Jr. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun 2009 Apr 2; 9:3*
4. Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer 1996 Apr 1; 77(7):1303-10*
5. Clemente C, Rao S, Lupetti R, Tragni G, Pisarra P, Bersani I, Parmiani G, Mihm MC Jr, Sensi M. Immunohistochemical analysis of the T-cell receptor beta-chain variable regions expressed by T lymphocytes infiltrating primary human melanoma. *Lab Invest 1998 May; 78(5):619-27*
6. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol 2009; 27(35):5944-51*
7. Amigorena S, Savina A. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol 2010 Feb; 22(1):109-17. Epub 2010 Feb 18*

8. Ma Y, Aymeric L, Locher C, Kroemer G, Zitvogel L. The dendritic cell-tumor cross-talk in cancer. *Curr Opin Immunol 2011 Feb; 23(1):146-52. Epub 2010 Oct 21*
9. Novellino L, Castelli C, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother 2005 Mar; 54(3):187-207. Epub 2004 Aug 7*
10. Parmiani G, De Filippo A, Novellino L, Castelli C. Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials. *J Immunol 2007 Feb 15; 178(4):1975-9*
11. Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci 2009 Nov; 100(11):2014-21. Epub 2009 Aug 1*
12. Quintarelli C, Dotti G, Hasan ST, De Angelis B, Hoyos V, Errichiello S, Mims M, Luciano L, Shafer J, Leen AM, Heslop HE, Rooney CM, Pane F, Brenner MK, Savoldo B. High-avidity cytotoxic T lymphocytes specific for a new PRAME-derived peptide can target leukemic and leukemic-precursor cells. *Blood 2011 Mar 24; 117(12):3353-62. Epub 2011 Jan 28*
13. Brichard VG, Lejeune D. Cancer immunotherapy targeting tumour-specific antigens: towards a new therapy for minimal residual disease. *Expert Opin Biol Ther 2008 Jul; 8(7):951-68*
14. Svobodová S, Browning J, MacGregor D, Pollara G, Scolyer RA, Murali R, Thompson JF, Deb S, Azad A, Davis ID, Cebon JS. Cancer-testis antigen expression in primary cutaneous melanoma has independent prognostic value comparable to that of Breslow thickness, ulceration and mitotic rate. *Eur J Cancer 2011 Feb; 47(3):460-9. Epub 2010 Nov 4*
15. Curioni-Fontecedro A, Nuber N, Mihic-Probst D, Seifert B, Soldini D, Dummer R, Knuth A, van den Broek M, Moch H. Expression of MAGE-C1/CT7 and MAGE-C2/CT10 Predicts Lymph Node Metastasis in Melanoma Patients. *PLoS One 2011; 6(6):e21418. Epub 2011 Jun 27*
16. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science 2011 Mar 25; 331(6024):1565-70*
17. Mendez R, Aptsiauri N, Del Campo A, Maleno I, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F, Garcia-Lora. A HLA and melanoma: multiple alterations in HLA class I and II expression in human melanoma cell lines from ESTDAB cell bank. *Cancer Immunol Immunother 2009 Sep; 58(9):1507-15. Epub 2009 Apr 2*
18. Maleno I, Aptsiauri N, Cabrera T, Gallego A, Paschen A, López-Nevot MA, Garrido F. Frequent loss of heterozygosity in the β2-microglobulin region of chromosome 15 in primary human tumors. *Immunogenetics. 2011 Feb; 63(2):65-71. Epub 2010 Nov 18*

19. Chang CC, Ferrone S. Immune selective pressure and HLA class I antigen defects in malignant lesions. *Cancer Immunol Immunother 2007 Feb; 56(2):227-36. Epub 2006 Jun 17*
20. Kageshita T, Ishihara T, Campoli M, Ferrone S. Selective monomorphic and polymorphic HLA class I antigenic determinant loss in surgically removed melanoma lesions. *Tissue Antigens 2005 May; 65(5):419-28*
21. Meije CB, Swart GW, Lepoole C, Das PK, Van den Oord JJ. Antigenic profiles of individual-matched pairs of primary and melanoma metastases. *Hum Pathol 2009 Oct; 40(10):1399-407. Epub 2009 Apr 22*
22. Lesport E, Baudhuin J, LeMaoult J, Sousa S, Doliger C, Carosella ED, Favier B. Human melanoma cell secreting human leukocyte antigen-G5 inhibit natural killer cell cytotoxicity by impairing lytic granules polarization toward target cells. *Hum Immunol 2009 Dec; 70(12):1000-5. Epub 2009 Aug 3*
23. Lasfar A, Cohen-Solal KA. Resistance to transforming growth factor β-mediated tumor suppression in melanoma: are multiple mechanisms in place? *Carcinogenesis 2010 Oct; 31(10):1710-7. Epub 2010 Jul 23*
24. Chang CC, Ferrone S. HLA-G in melanoma: can the current controversies be solved? *Semin Cancer Biol 2003; 13(5):361-9*
25. Ivanov VN, Partridge MA, Huang SX, Hei TK. Suppression of the proinflammatory response of metastatic melanoma cells increases TRAIL-induced apoptosis. J Cell Biochem 2011 Feb; 112(2):463-75
26. Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-κB as the matchmaker. *Nat Immunol*. 2011 Jul 19;12(8):715-23
27. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol 2009 Aug; 9(8):581-93. Epub 2009 Jun 5*
28. Iero M, Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Parmiani G, Fais S, Rivoltini L. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ 2008 Jan; 15(1):80-8. Epub 2007 Oct 12*
29. Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Borghi M, Calabrò L, Spada M, Perdicchio M, Marino ML, Federici C, Iessi E, Brambilla D, Venturi G, Lozupone F, Santinami M, Huber V, Maio M, Rivoltini L, Fais S. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One 2009; 4(4):e5219. Epub 2009 Apr 17*
30. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol 2008 Dec; 10(12):1470-6. Epub 2008 Nov 16*
31. Yun J, Rago C, Cheong I, Pagliarini R, Angenendt P, Rajagopalan H et al. Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science 2009; 325(5947):1555-9*

32. De Milito A, Canese R, Marino ML, Borghi M, Iero M, Villa A et al. pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. *Int J Cancer 2010; 127(1):207-19*
33. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer 2010 Aug 15; 127(4):759-67*
34. Addey C, White M, Dou L, Coe D, Dyson J, Chai JG. Functional plasticity of antigen-specific regulatory T cells in context of tumor. *J Immunol 2011 Apr 15; 186(8):4557-64. Epub 2011 Mar 9*
35. Slingluff CL Jr, Petroni GR, Chianese-Bullock KA, Smolkin ME, Ross MI, Haas NB, von Mehren M, Grosh WW. Randomized multicenter trial of the effects of melanoma-associated helper peptides and cyclophosphamide on the immunogenicity of a multipeptide melanoma vaccine. *J Clin Oncol 2011 Jul 20; 29(21):2924-32. Epub 2011 Jun 20*
36. Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, Platell C, Iacopetta B. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol 2009 Jan 10; 27(2):186-92. Epub 2008 Dec 8*
37. Camisaschi C, Casati C, Rini F, Perego M, De Filippo A, Triebel F, Parmiani G, Belli F, Rivoltini L, Castelli C. LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. *J Immunol 2010 Jun 1; 184(11):6545-51. Epub 2010 Apr 26*
38. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol 2009 Mar; 9(3):162-74*
39. Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, Castelli C, Mariani L, Parmiani G, Rivoltini L. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol 2007 Jun 20; 25(18):2546-53*
40. Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, Høyer M, Maniecki MB, Sjoegren P, Christensen IJ, Steiniche T. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. *J Clin Oncol 2009 Jul 10; 27(20):3330-7. Epub 2009 Jun 15*
41. Gajewski TF, Fuertes M, Spaapen R, Zheng Y, Kline J. Molecular profiling to identify relevant immune resistance mechanisms in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol 2011 Apr; 23(2):286-92. Epub 2010 Dec 23*
42. Sznol M. Betting on immunotherapy for melanoma. *Curr Oncol Rep 2009 Sep; 11(5):397-404*

5.0 DIAGNOSI

5.1 Diagnosi clinica
5.2 Forme speciali
5.3 Diagnosi dermoscopica
5.4 Monitoraggio digitale
5.5 Fotografia dell'intera superficie cutanea
5.6 Innovazione e sviluppo tecnologico

Il melanoma cutaneo è un tumore cutaneo maligno di origine neuroectodermica che insorge nella maggior parte dei casi *de novo* su cute apparentemente sana o, in una minoranza di soggetti, dalla modificazione di un nevo pre-esistente. Il melanoma può comparire ovunque sulla cute, ma più frequentemente insorge sul tronco nell'uomo e sugli arti inferiori nella donna.
L'esame clinico integrato dalla valutazione strumentale tramite dermoscopia ha aperto una nuova frontiera diagnostica soprattutto nella valutazione del melanoma sottile, di dimensioni limitate (< 6 mm) e nelle forme in cui i parametri clinici ABCDE non sono significativi (1-3).
In ambulatorio medico, la visita prevede la valutazione sia della neoformazione riferita dal paziente sia di tutto l'ambito cutaneo, in condizioni d'illuminazione ottimale e con l'uso di una lente d'ingrandimento.

5.1 Diagnosi clinica

Il riconoscimento di un potenziale melanoma cutaneo si basa sull'osservazione diretta della disomogenea distribuzione del colore, della differenza delle caratteristiche geometriche (forma), dell'irregolarità del profilo (superficie e bordi), associata alle modificazioni temporali della lesione pigmentata.
La formula didattica dell'ABCDE (vedi Tabella 1, sottocap. 6.2) sintetizza l'identificazione di tali variazioni. La presenza di un parametro dell'ABCDE o la comparsa di una lesione più scura "brutto anatroccolo" o "nano nero", che si differenzia proprio per gli aspetti cromatici dagli altri nevi melanocitici presenti nello stesso individuo, può far sospettare il melanoma e rappresenta la guida per una corretta

gestione dei pazienti da parte del medico e per l'invio di lesioni pigmentate cutanee selezionate al dermatologo (4).
In rapporto alle diverse modalità morfologiche ed evolutive possiamo suddividere le caratteristiche cliniche del melanoma cutaneo in tre forme principali: melanoma piano, melanoma piano-cupoliforme e melanoma cupoliforme (4).

Il melanoma piano o sottile è il marcatore clinico-patologico della diagnosi precoce, dove la formula dell'ABCDE trova la sua razionale applicazione.
Rappresenta la forma più frequente (70%), con uno spessore di Breslow favorevole ed un'evoluzione lenta, soprattutto se paragonata a quella del melanoma cupoliforme. Si presenta generalmente come una lesione di dimensioni variabili da 5-6 mm a parecchi centimetri, a margini netti ed irregolari. Può essere piana (melanoma piano non palpabile) o leggermente rilevata, talora indentata, palpabile, che spesso presenta al suo interno micropapule con perdita della normale plicatura cutanea. A volte è presente eritema perilesionale.
Il colore del melanoma piano è variabile dal marrone variegato al nero, ma può mostrare anche aree rosate (neoangiogenesi) o bianco-grigiastre (regressione).
L'evoluzione del melanoma piano nella fase di accrescimento verticale, che invariabilmente fa seguito alla fase radiale, è rappresentata dal *melanoma piano-cupoliforme* caratterizzato dalla comparsa di un elemento papuloso e/o nodulare nel contesto della lesione.

Il *melanoma cupoliforme* è una variante di melanoma a rapida evoluzione e prognosi spesso infausta, che tende a comparire in età più avanzata (5). Il melanoma nodulare, come oggi si preferisce definire il melanoma cupoliforme, termine ormai caduto quasi completamente in disuso, rappresenta il 10-15% di tutti i melanomi.
Il melanoma nodulare è caratterizzato dalla comparsa, *ab initio*, di un nodulo simmetrico, a volte peduncolato, di un colore variabile dal bruno-nerastro al nero-bluastro al rosso-marrone. Il pigmento può essere distribuito irregolarmente o essere del tutto assente (melanoma acromico). In questo caso, è importante esaminare la periferia della lesione per valutare l'eventuale presenza di melanina in un bordo, la cosiddetta "fuga di pigmento". E' frequente l'osservazione di ulcerazione e sanguinamento spontaneo della lesione. Spesso, i melanomi vengono misconosciuti come tumori della pelle

non-melanocitari, generalmente questi crescono rapidamente e la loro escissione chirurgica è urgente. I melanomi nodulari ammontano almeno alla metà dei melanomi spessi e sembrano dare un contributo altamente sproporzionato alla mortalità. E' necessaria più attenzione per questo tipo di presentazione in modo tale da attuare più spesso una terapia urgente. La loro presentazione clinica può essere riassunta con l'acronimo EFG (*Elevated*-rilevato, *Firm*-fisso, *Growing progressively*-progressivamente in crescita) (6) (vedi cap. 6.0). Il melanoma può insorgere, oltre che su cute sana, su un nevo melanocitico pre-esistente, acquisito o congenito. I possibili segnali di allarme di associazione del nevo con il melanoma sono la variazione del colore, l'improvvisa comparsa di una lesione rilevata (papula o nodulo) nel contesto del nevo melanocitico, il rapido aumento della dimensione o dello spessore della lesione pigmentata, la comparsa di erosione, di gemizio sieroso e di sanguinamento e la conseguente formazione di croste siero-ematiche od ematiche, la comparsa di segni di flogosi e/o di sintomi soggettivi (prurito, dolore). Si noti che cambiamenti di forma e di colore possono peraltro verificarsi in un nevo melanocitico, anche per cause di natura benigna (follicolite intranevica, intensa esposizione solare, gravidanza, traumi accidentali, ecc.) (4).

Melanoma Nevo Associato

L'associazione tra nevo melanocitico e melanoma è stata riportata nelle varie casistiche in una percentuale intorno al 20-30% dei casi di melanoma. In uno studio effettuato nella Clinica Dermatologica di Firenze, su 131 casi di melanoma (7), la percentuale di associazione era del 20,6%. Inoltre, lo stesso studio evidenziava come la storia di ustioni solari era un fattore predittivo del rischio di melanoma solo nei melanomi associati a nevo (7).

5.2 Forme speciali

Lentigo maligna e lentigo maligna melanoma (LMM)

Una forma particolare di melanoma è la *lentigo maligna*, che è un melanoma *in situ* che insorge nelle sedi foto-esposte, in particolare volto e collo, di persone di età avanzata (70-80 anni) (5) (vedi cap. 7.0). Si tratta di una lesione a lenta evoluzione che si manifesta come una chiazza asimmetrica, piana, non palpabile, variamente pigmentata dal marrone al nero, con aree di ipopigmentazione, molto liscia,

con perdita del normale profilo cutaneo. Si accresce a lungo, senza mostrare segni di invasività verticale, che si manifesta solo tardivamente, dopo anni dall'insorgenza della lesione, quando compaiono dei noduli sulla superficie della *lentigo maligna* (*lentigo maligna* melanoma). In questa fase, il decorso e la prognosi di questo tipo di melanoma diventa simile a quelli delle altre forme. Il LMM rappresenta dal 4% al 15% di tutti i melanomi cutanei. Il colore della *lentigo* varia nel tempo dal marrone uniforme al marrone scuro ed al nero.

Melanoma acrale-lentigginoso ed ungueale

Il melanoma acrale-lentigginoso è caratterizzato istopatologicamente, oltre che da un'acantosi dell'epidermide, da una proliferazione sia basale sia intra-epidermica di melanociti atipici senza formazione di *clusters* e da un allungamento degli sproni epiteliali. Il termine "lentigginoso" è dovuto al particolare *pattern* di crescita di questo tipo di melanoma, che istopatologicamente è caratterizzato da uno strato di melanociti maligni disposti lungo lo strato basale dell'epidermide (vedi cap. 7.0). Il termine "acrale", invece, definisce la localizzazione di questo tipo di melanoma, che insorge a livello delle estremità, cioè a livello delle regioni palmari, plantari e del letto ungueale (8). Questo tipo di melanoma, che rappresenta solo il 5% di tutti i melanomi, è l'unica varietà che insorge in tutti i foto-tipi, anche nei soggetti di pelle scura. Rappresenta circa la metà dei melanomi che insorgono in corrispondenza delle mani e dei piedi. Nella fase iniziale, si può presentare in maniera subdola con una chiazza a limiti non ben definiti di colore variabile dal marrone al grigio, a bordi irregolari, che nel tempo aumenta di dimensioni fino a mostrare la comparsa di papule e noduli nel contesto della chiazza, indice di un coinvolgimento dermico da parte della neoplasia (9). Quindi, il melanoma acrale-lentigginoso presenta alcuni aspetti clinici ed istologici simili a *lentigo maligna* melanoma, ma rispetto a questa varietà ha un comportamento biologico più aggressivo.

Il melanoma subungueale è infrequente nella popolazione generale, rappresentando una percentuale variabile tra lo 0,7% ed il 3,5% di tutti i melanomi (10). La sua incidenza è sovrapponibile nelle varie etnie. Il melanoma subungueale si presenta più frequentemente con una colorazione anomala dell'unghia, a cui fa seguito la comparsa di un nodulo oppure di una fessurazione, che tende a non guarire con ripetuti sanguinamenti a livello del letto ungueale. In fase avanzata,

l'onicodistrofia determinata dal tumore si associa spesso al distacco dell'unghia. La pigmentazione si estende frequentemente dall'epitelio del letto ungueale alla piega ungueale prossimale e alla cuticola, determinando il cosiddetto segno di Hutchinson (9).
Alla presentazione clinica, il paziente può già presentare lesioni avanzate, poiché molti soggetti aspettano diversi mesi od anche anni, prima di rivolgersi ad un medico per la valutazione delle alterazioni ungueali. Il melanoma subungueale presenta diverse diagnosi differenziali, che comprendono ematoma subungueale, traumatismo cronico, onicomicosi. La diagnosi differenziale, anche per un dermatologo esperto, non è sempre facile e questo comporta spesso un importante ritardo diagnostico, a cui consegue una riduzione delle *chance* di un trattamento precoce, che è cruciale nel determinare la prognosi del paziente (10).

Melanoma acromico
Il melanoma acromico o amelanotico è un sottotipo di melanoma che, all'esame clinico, appare parzialmente o completamente privo di pigmento. Secondo dati della letteratura, il melanoma acromico rappresenta circa il 2-8% di tutti i melanomi, con un'incidenza maggiore a livello delle estremità rispetto alle altre sedi corporee.
L'attuale orientamento della letteratura è quello di classificare, in base all'estensione dell'ipopigmentazione, le forme amelanotiche in melanomi amelanotici "veri", completamente privi di pigmento all'esame clinico/dermoscopico e melanomi in parte pigmentati o ipomelanotici. Quest'ultimi si suddividono in melanomi parzialmente pigmentati, nei quali l'area pigmentata può coprire un'area $\leq 25\%$ della superficie totale e melanomi lievemente pigmentati, nei quali in realtà una pigmentazione molto tenue, generalmente di colorito marrone chiaro o grigio chiaro con focali variazioni della sua intensità è presente su tutta o parte della lesione (11).
I "veri" melanomi amelanotici, che mostrano cioè una completa assenza di pigmento, sono rari, in quanto una parte di pigmentazione, anche di modesta entità, è spesso apprezzabile alla periferia della lesione. Questa caratteristica è nota con il nome di "fuga di pigmento". La diagnosi differenziale con diverse lesioni melanocitarie e non, sia benigne sia maligne, è spesso difficile ed un aiuto importante viene offerto dalla valutazione dermoscopica, soprattutto dall'esame del *pattern* vascolare (12). Il melanoma amelanotico insorge più frequentemente in pazienti anziani e si presenta clinicamente come

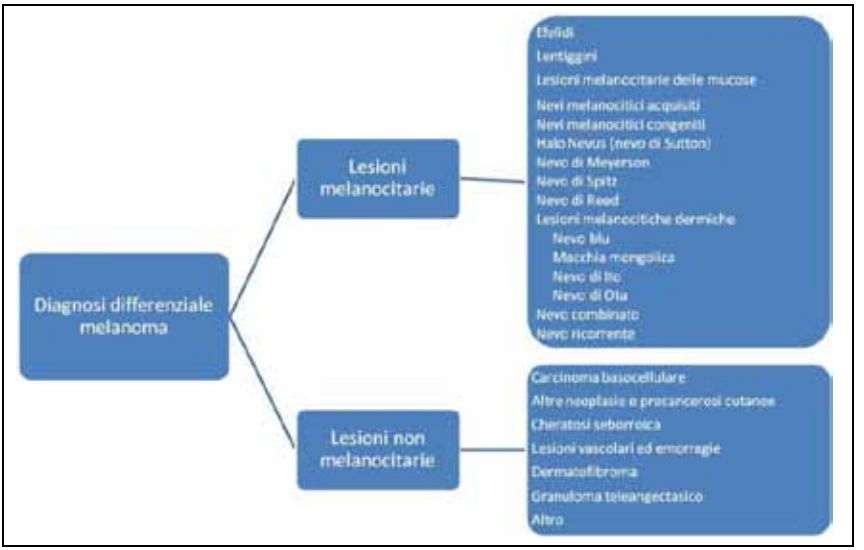
una macula, una papula od una placca eritematosa simil-angiomatosa, talora desquamante, altre volte come una placca ipercheratosica, che può ricordare una verruca, altre volte ancora sotto forma di un nodulo esofitico, spesso eroso in superficie.
Sulla cute foto-esposta, danneggiata dalle radiazioni solari, può manifestarsi come una macula eritematosa con alterazioni dell'epidermide (squame o lieve rilievo), che simulano lesioni infiammatorie benigne, basaliomi, malattia di Paget e malattia di Bowen oppure può presentarsi come una placca/nodulo che, se di consistenza dura e dello stesso colore della pelle, potrebbe essere riferibile ad un melanoma desmoplastico. Sulla cute non foto-esposta, si manifesta nella forma nodulare esofitica, spesso erosa e sanguinante, che simula il cheratoacantoma, il carcinoma a cellule di Merkel, il granuloma piogenico o emangioma (13). La presentazione clinica più frequente è quella papulo-nodulare, segue la forma in placca senza alterazioni della superficie epidermica e dello stesso colore della pelle, mentre meno frequente è la forma maculare eritematosa con alterazioni della superficie epidermica (14).
Data l'estrema variabilità dell'aspetto clinico, il "vero" melanoma amelanotico è stato definito "il grande simulatore", al quale è associato il rischio di non essere riconosciuto, specie nelle sue fasi iniziali, e pertanto di non essere asportato, con conseguente peggioramento della prognosi per il paziente.

Diagnosi differenziale

Lesioni melanocitarie

I nevi melanocitici sono le principali lesioni in diagnosi differenziale con il melanoma (Figura 1).

Figura 1



Un nevo melanocitico presente dalla nascita (nevo congenito) o insorto durante l'infanzia, l'adolescenza o in età adulta (nevo acquisito), dopo un periodo di lenta crescita rimane stazionario. La distribuzione omogenea del colore, la regolarità delle caratteristiche geometriche e le scarse variazioni temporali del nevo sono indicatori di benignità.
E' necessaria una particolare attenzione ai pazienti che presentano numerosi nevi melanocitici acquisiti di diametro > 5 mm e nevi clinicamente atipici. La presenza o la modificazione dei parametri ABCDE nel contesto di un nevo acquisito consiglia l'invio presso un Centro specialistico per la valutazione clinico-strumentale.
Nel caso di un nevo congenito è sospetta la comparsa sul bordo di una macchia nerastra o l'insorgenza di un nodulo acromico o pigmentato nel contesto della lesione nevica.
Per lesioni melanocitarie delle mucose si intendono le lentiggini, che, seppur raramente, si possono osservare anche a livello del cavo orale (palato, gengiva e labbra), le melanosi vulvari (molto frequenti) ed i nevi melanocitici acquisiti comuni. Il termine "lesioni melanocitiche dermiche" include un ampio gruppo di lesioni (macchia mongolica, nevo di Ota, nevo di Ito, nevo blu, nevo blu maligno, amartoma melanocitico dermico, melanoma metastatico simil-nevo blu,

facomatosi pigmento vascolare ed amartoma neurocristico cutaneo), alcune delle quali sono citate anche nella Figura 1 quali possibili diagnosi differenziali del melanoma.

Lesioni non melanocitarie

La *lentigo* senile o solare, quando assume una colorazione molto intensa, con diametro > 2-3 cm, forma irregolare e bordi mal definiti, rende molto difficile la diagnosi differenziale con la *lentigo maligna*. La cheratosi seborroica, comune neoformazione cheratosica, si può confondere con il melanoma, quando è policroma, o si allarga rapidamente, sanguina, o se si ulcera e forma una crosta con o senza prurito. Il dermatofibroma simula il melanoma per la presenza di un nodulo scuro con alone infiammatorio, ma la palpazione rileva la durezza della lesione e la localizzazione dermica "a pastiglia". Altre lesioni in diagnosi differenziale sono: la cheratosi attinica pigmentata, il carcinoma basocellulare pigmentato, il carcinoma spinocellulare, il granuloma piogenico e le lesioni vascolari (emangioma trombizzato, angiocheratoma, ematoma subungueale, emorragia intra-epidermica) (9).

Ogni lesione pigmentata di non chiaro inquadramento diagnostico e/o a rapida insorgenza e/o con modifiche cromatiche recenti deve essere sottoposta ad approfondimento specialistico con asportazione chirurgica ed esame istologico.

5.3 Diagnosi dermoscopica

La visita dermatologica contemporaneamente all'osservazione diretta, ad occhio nudo, è integrata dall'osservazione strumentale in dermoscopia. L'esame clinico e dermoscopico abbassa la soglia del melanoma falso negativo. La dermoscopia abbassa anche la soglia dei falsi positivi, permettendo di asportare un numero inferiore di lesioni pigmentate benigne (15).

Infatti, la dermatoscopia è interattiva con l'esame dei parametri clinici, quali l'età del paziente, il foto-tipo, il numero e la tipologia degli altri nevi, la sede e la storia evolutiva della lesione, ecc., che sono in grado di aumentare l'accuratezza della diagnosi finale (16).

La dermoscopia (anche definita microscopia in epiluminescenza, dermatoscopia, microscopia a luce riflessa) è una tecnica *in vivo* non invasiva, che permette di valutare a più forte ingrandimento

la neoformazione scura o parzialmente pigmentata per individuare la presenza di strutture sub-microscopiche e vascolari, la distribuzione del pigmento e migliorare l'interpretazione diagnostica del melanoma, in particolare sottile, dei nevi melanocitici e delle lesioni non melanocitarie (carcinomi cutanei, cheratosi seborroica, dermatofibroma, angioma angiocheratoma, ecc.) (1,16,17).
Tale esame può essere eseguito con vari strumenti, come il dermatoscopio, lo stereomicroscopio tridimensionale, il videodermatoscopio a luce polarizzata e non polarizzata e da macchine fotografiche digitali dotate di specifici obiettivi.
Ci sono sottili differenze nei caratteri dermoscopici delle strutture cutanee analizzate con una luce non polarizzata, rispetto alla dermoscopia a luce polarizzata. Il sistema polarizzato permette una migliore visualizzazione dei vasi, delle aree rosse e delle strutture a crisalide. La dermoscopia non polarizzata richiede l'applicazione di un liquido o di un gel nell'interfaccia tra lo strumento e la superficie cutanea. Inoltre, lo studio del *pattern* vascolare può essere compromesso dall'eccessiva pressione dello strumento con conseguente compressione dei vasi, che quindi non possono essere correttamente esaminati nella loro reale morfologia. D'altra parte, strutture come le pseudocisti, i punti grigio-blu multipli ed il velo blu-biancastro sono meglio apprezzabili con la dermatoscopia non polarizzata.
Vestergaard et al. (18) hanno riportato che la valutazione dermoscopica è più accurata rispetto all'esame ad occhio nudo della superficie cutanea per la diagnosi di melanoma cutaneo (OR=15,6, p=0,016). In questo studio, il valore medio della sensibilità nella diagnosi di melanoma era del 74% per l'esame ad occhio nudo e del 90% per la dermoscopia. Tali dati sono sovrapponibili a quelli riportati da altri studi che stimavano per l'esame dermatoscopico una sensibilità del 10-27% più alta rispetto al solo esame clinico (19). Inoltre, questo incremento della sensibilità da parte della dermoscopia nella diagnosi di melanoma non comporta una riduzione della specificità, sebbene alcuni Autori abbiano riportato un aumento del numero di escissioni non necessarie di lesioni benigne (19).
Al contrario, secondo altri Autori l'integrazione di esame ad occhio nudo e valutazione dermoscopica permette una significativa riduzione della percentuale di pazienti destinati alla biopsia della lesione, ma solo presso Centri di riferimento per lesioni pigmentate (Argenziano et al., JAAD 2011, *in press*).

Modalità diagnostica

Il primo orientamento nel corso d'esame dermoscopico è legato alla valutazione del colore, del grado di pigmentazione e della sua relativa distribuzione nell'ambito della lesione pigmentata.

La melanina rappresenta il pigmento più importante nel determinare differenti *pattern* strutturali e cromatici. Secondo la localizzazione del pigmento melanico nei vari strati cutanei, la lesione pigmentata osservata assume una colorazione differente (Tabella 1). Altri colori visualizzati durante l'esame dermoscopico sono le tonalità del bianco, indicative di regressione e del rosso, correlate prevalentemente alla vascolarizzazione.

Tabella 1 Il colore della melanina in relazione alla localizzazione epidermica e dermica

Sede del pigmento	*Colore della lesione in ELM*
Strati superficiali: corneo, spinoso	Nero
Zona giunzionale	Marrone chiaro o marrone scuro in rapporto alla concentrazione del pigmento
Derma papillare	Blu ardesia
Derma reticolare	Blu acciaio

ELM: microscopia in epiluminescenza

Nei nevi melanocitici il colore di base è regolare, omogeneo, a limiti sfumati, più addensato al centro della lesione. Nel melanoma, e talora nei nevi in regressione, invece le aree di pigmentazione sono disomogenee, asimmetriche, irregolari, policrome, localizzate a volte alla periferia della lesione (policromia asimmetrica interna). La presenza di numerose tonalità di colore (più di tre colori), la marcata disomogeneità ed un'interruzione improvvisa del disegno pigmentario in periferia possono rappresentare un criterio cromatico importante per la diagnosi di melanoma.

Oltre al *pattern* cromatico possono essere visualizzate caratteristiche microstrutturali e vascolari, che presentano numerose modalità di presentazione di tipo cromatico e geometrico (ad esempio distribuzione,

ampiezza, calibro, ecc.) (12,20-23). Sono riassunte nella Tabella 2 le principali caratteristiche dermoscopiche delle lesioni melanocitarie.

Tabella 2 Caratteristiche dermoscopiche principali delle lesioni melanocitarie

Reticolo pigmentario	Il reticolo pigmentario è il marcatore delle lesioni melanocitarie caratterizzato da un disegno reticolare o a canestro più o meno accentuato. Il disegno della rete nei nevi melanocitici è poco accentuato, a maglie regolari, a linee sottili e strette e sfuma gradualmente verso la periferia. Invece, nel melanoma, presenta una struttura spessa, colore nero a maglie irregolari (reticolo atipico) che s'interrompe bruscamente alla periferia dove si può suddividere in multiple branche di colore nero o marrone scuro (pseudopodi e/o strie radiali).
Strie radiali	Strutture periferiche del reticolo atipico che si presentano in gruppi ravvicinati, lineari e paralleli, orientati radialmente.
Pseudopodi	Strutture periferiche del reticolo atipico ma a differenza delle strie radiali sono incurvate, tipo proiezioni a forma di dita. Occasionalmente possono presentare piccole nodosità sui loro apici, come delle ramificazioni.
Globuli	Sono corpi sferici rotondi od ovali, di colore dal marrone scuro al nero brunastro. Sono uniformi nei nevi, mentre possono variare di dimensioni, forma e colore nei nevi atipici o nel melanoma.
Punti	Si presentano come piccole strutture globulari, punctate, a carattere focale, più piccole rispetto ai globuli. Generalmente, si tratta di corpiccioli intensamente nerastri, per la presenza di numerosi melanociti intensamente pigmentati o di melanina libera a livello dello strato corneo e/o granuloso.
Macchie ad inchiostro (*blotches*)	Aree prive di strutture scure diffuse o localizzate correlate alla iperpigmentazione epidermica e/o del derma superficiale. Nel melanoma sono irregolari nelle forme e disomogenee come tonalità di colore.
Strutture di regressione	Sono caratterizzate da aree bianche (fibrosi) o anche rosate per neoangiogenesi e flogosi. Un altro aspetto della regressione, spesso presente nel melanoma, è caratterizzato da aree grigie bluastre o bluastre che si presentano sia sotto forma di granuli isolati disseminati sia come agglomerati come macchie mal definite.
Velo bianco-bluastro	Il velo bianco è un parametro dermoscopico cromaticamente simile al fondo di bicchiere a carattere uniforme e diffuso o focalmente variabile ed irregolare. Si evidenzia in lesioni pigmentate aventi una forte pigmentazione omogenea di colore nero o bruno-intenso associato ad ispessimento dell'epidermide: E' frequente nel melanoma.
Strutture vascolari atipiche	Aspetti differenti legati essenzialmente alla neoangiogenesi prodotta dalla progressione neoplastica. Si possono presentare come globuli o aree rosse lattescenti, vasi a forcina, vasi lineari irregolari, vasi puntiformi o polimorfi. Sono spesso presenti nel melanoma amelanotico.

Le procedure diagnostiche dermoscopiche principalmente usate sono: la *pattern analysis* (20), l'ABCD di Stolz (24), il metodo di Menzies (22), la *Seven-point check list* (23) ed infine, la stratificazione del livello di rischio modificata (25). Recentemente, altri modelli classificativi sono stati sviluppati, come il *Cash algorithm* (26) e la *Three-point check list* (27), ma il loro impatto pratico rimane limitato.
La *pattern analysis* è risultata superiore agli algoritmi più utilizzati (ABCD di Stolz, *Menzies method, Seven-point check list*), in termini di efficienza diagnostica, da un gruppo di operatori esperti a livello internazionale che si sono confrontati per via telematica nell'ambito della *Consensus Net Meeting on Dermoscopy* (CNMD) (28).
Tale metodo classificativo utilizza un processo di inquadramento diagnostico che tiene conto del riconoscimento analitico di tutti i parametri dermoscopici della lesione pigmentata e della prevalenza delle singoli variabili (ad esempio reticolo: presente/assente; se presente: regolare vs irregolare, sottile vs spesso, ecc.).
Dopo aver identificato se la lesione è di natura melanocitaria o non melanocitaria, la diagnosi di melanoma o nevo melanocitico rappresenta la tappa successiva con la valutazione complessiva e comparativa dei parametri riscontrati.
La *pattern analysis* rappresenta la procedura diagnostica più utilizzata dalla maggioranza dei dermatologi e la sua efficienza è correlata al grado di esperienza dell'osservatore.
In generale, il maggiore grado d'atipia melanocitica (sospetto melanoma) è strettamente correlato al numero di strutture, alla loro irregolare distribuzione ed alla presenza di policromia disomogenea (> 3 colori). In particolare, l'asimmetria dermoscopica, il reticolo atipico e le strutture di regressione sono risultati i più specifici criteri dermoscopici per la diagnosi del melanoma precoce (28).
Nell'ambito delle attività dell'*International Society of Dermoscopy* sono presenti *tutorial* educazionali e *forum* di discussione sui casi clinici (www.dermoscopy-ids.org).

5.4 Monitoraggio digitale

Il monitoraggio digitale, più comunemente definito come mappatura computerizzata (*mole mapping*), si usa per monitorare le lesioni melanocitarie con caratteri di atipia senza evidenza di criteri melanoma specifici, con rivalutazione e confronto delle modifiche

a breve termine (3-6 mesi) od a lungo termine (> 6 mesi).
Attualmente, l'accuratezza diagnostica di questa metodica non è ancora stata determinata.
Nell'ambito delle applicazioni pratiche, anche se mancano criteri dermoscopici univoci per il riconoscimento dei parametri che definiscono una "lesione da archiviare per il *follow-up*", i nevi melanocitici che maggiormente possono nascondere un potenziale melanoma sono: 1) nevo con iperpigmentazione eccentrica; 2) nevo con ipopigmentazione eccentrica; 3) nevo melanocitico con *pattern* omogeneo nero (senza lamella cornea); 4) nevo con ipo/iperpigmentazione multifocale (15).
Secondo le Linee Guida Italiane di Dermatoscopia (29) e dell'*International Dermoscopy Society* (30), in presenza di lesioni melanocitarie atipiche piane si può consigliare uno stretto monitoraggio dermoscopico (3-6 mesi), dove qualsiasi variazione suggerisce l'asportazione chirurgica.
Tuttavia, è fortemente consigliata l'escissione chirurgica in presenza di una singola lesione atipica ("brutto anatroccolo" clinico-dermoscopico), per la contemporanea presenza di strutture reticolari, globulari ed omogenee, per la presenza di iperpigmentazione eccentrica o per una chiara storia anamnestica di recenti modifiche (16,29,30).
Il *follow-up* digitale non dovrebbe mai essere eseguito nelle lesioni nodulari che presentano caratteri di atipia, data l'impossibilità di escludere con certezza una diagnosi di melanoma nodulare (29,30).
Dal punto di vista pratico, il ricorso all'archiviazione digitale dell'immagine per il controllo nel tempo è da limitarsi a casi selezionati, nei quali il clinico abbia adeguatamente confrontato gli eventuali benefici (evitare una biopsia escissionale inutile) con i rischi (lasciare in sede un possibile melanoma). Anche la possibilità che il paziente non si presenti al controllo successivo deve essere tenuta in adeguata considerazione (31). Tuttavia, è evidente che alcune lesioni melanocitarie con caratteristiche di melanomi *nevus-like* possono trarre beneficio dal monitoraggio digitale a breve termine (31).
I risultati dello studio italiano META (*MElanoma TAsk force*) sul monitoraggio digitale (in corso di pubblicazione) sembrano in contraddizione con quello che appare essere l'utilizzo della metodica e conferma i risultati riportati da Carli et al. (32) nello studio multicentrico italiano che ha evidenziato la mancanza di chiari e standardizzati criteri di inclusione e di esclusione per il *follow-up* digitale. Anche il risultato dello studio META mostra un'asimmetria

tra l'applicazione della metodica e l'impatto pratico basato sulle evidenze cliniche attualmente disponibili.
Pertanto, anche se il monitoraggio digitale ci permette di caratterizzare meglio l'evoluzione di una lesione melanocitaria, i risultati dello studio META mantengono aperte le questioni sui vantaggi e sui limiti della metodica per identificare un potenziale melanoma *nevus-like* od un *featureless* melanoma.

5.5 Fotografia dell'intera superficie cutanea

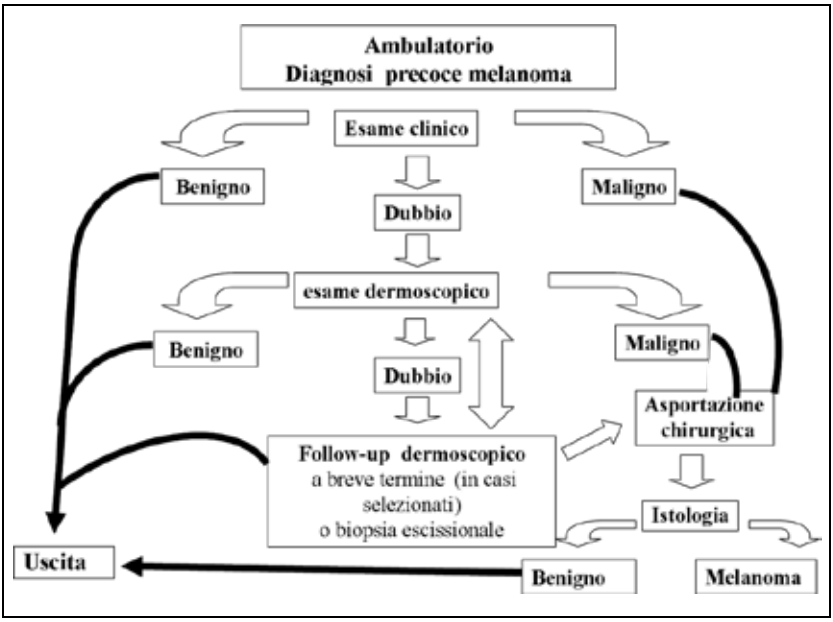
Il solo esame clinico ha varie limitazione, relative alla capacità e all'esperienza dell'osservatore e, soprattutto, all'impossibilità dell'occhio e della memoria umani di obiettivare la comparsa di nuove lesioni e/o i cambiamenti nel tempo di altre. Perciò, nel corso degli anni, le metodiche di foto-documentazione sono state progressivamente migliorate fino a raffinati sistemi di fotografia *total body* (9). Il razionale del suo impiego si basa sull'acquisizione da parte del dermatologo della capacità di obiettivare l'evoluzione o l'insorgenza di una lesione, fotografando il paziente alla prima visita ed a tutte le visite di *follow-up*. Nel caso di pazienti a rischio, in particolare in pazienti con molti nevi (> 50), l'immagazzinamento di immagini dell'intera superficie cutanea rappresenta, secondo molti, uno *step* fondamentale per il *follow-up* e per ridurre il rischio di lasciare in sede un potenziale melanoma. Recentemente, uno studio ha evidenziato che nei pazienti ad elevato rischio di melanoma il *follow-up* digitale in due *step*, ovvero comprendente sia fotografia *total body* sia dermoscopia, rappresenta allo stato attuale il miglior metodo per incrementare la diagnosi precoce del melanoma, con un aumento della diagnosi di forme sottili ed *in situ* e, allo stesso tempo, per ridurre il numero di escissioni inutili (33). Feit et al. (34) hanno dimostrato che i sistemi di fotografia *total body* aumentano sia la sensibilità sia la specificità del *follow-up* nei pazienti ad alto rischio.

5.6 Innovazione e sviluppo tecnologico

Negli ultimi anni, numerose metodiche sono state introdotte allo scopo di migliorare la sensibilità e la specificità della diagnosi di melanoma, ma anche per diagnosticare la patologia in una fase sempre più

precoce. In particolare, la diagnosi *computer* assistita è in grado di misurare in maniera oggettiva i parametri morfologici della lesione analizzata, mentre la microscopia *laser* confocale (RCM, *Reflectance Confocal Microscopy*) permette di visualizzare in tempo reale caratteristiche di aspetto simile a quelle istologiche.
La diagnosi *computer* assistita è un formidabile strumento per valutare dati oggettivi di tipo cromatico e geometrico del melanoma e dei nevi melanocitici. Tuttavia, nonostante molti anni dall'implementazione, la sua applicazione pratica specificatamente rivolta alla diagnosi automatica rimane controversa e presenta numerose limitazioni (35).
Recentemente, la RCM è entrata nel percorso diagnostico della patologia melanocitaria con risultati promettenti e con impatto immediato per la ricerca e la pratica routinaria (36-39).
La RCM è uno strumento diagnostico non invasivo, che produce immagini tessutali *in vivo*, con una risoluzione simile a quella istologica. Impiega un raggio *laser* a bassa potenza 830 nm (vicino all'infrarosso), che scannerizza la pelle orizzontalmente, producendo dettagliate immagini in bianco e nero, dall'epidermide fino al derma papillare superiore, con uno spessore che arriva a 200-300 μm. Il contrasto delle immagini RCM è dovuto prevalentemente alla differenza nella riflettenza dei componenti tessutali e della melanina citoplasmatica e le lesioni melanocitarie rappresentano il tessuto più appropriato per l'esame RCM. Recentemente, la RCM ha permesso di correlare *in vivo* i parametri dermoscopici con gli aspetti cito-architetturali delle lesioni melanocitarie. L'analisi in RCM delle lesioni melanocitarie è routinariamente condotta dalla valutazione di mosaici e/o una serie di immagini ad alta risoluzione, dall'epidermide al derma superficiale. Gli aspetti caratteristici del confocale sono generalmente analizzati a 3 diversi livelli tessutali: strato epidermico superficiale, giunzione dermo-epidermica e derma superficiale. Una *Consensus Conference* ha indicato i parametri architetturali, cellulari e tessutali, che si possono analizzare durante la valutazione con la RCM (36) e sono stati sviluppati algoritmi diagnostici per la diagnosi del melanoma con risultati promettenti sia per la ricerca sia per l'applicazione clinica (36-39).
In conclusione, lo *standard* diagnostico è rappresentato dalla valutazione integrata clinica e dermoscopica. Nella valutazione di ogni lesione, lo specialista è tenuto ad applicare la sinopsi diagnostica completa, che deve prendere in considerazione tutti i parametri anamnestici, clinici e dermatoscopici (Figura 2).

Figura 2 Flow-chart nella gestione del paziente con lesioni melanocitarie



Rimane tuttavia uno spettro dei melanomi *nevus-like*, in cui la diagnostica è difficile e nelle multiple lesioni piane atipiche solo il monitoraggio dermoscopico a breve termine può fornire degli indicatori di sospetto (22,31). Tuttavia, la procedura del monitoraggio digitale è da limitare a personale esperto e non da estendere acriticamente a tappeto a tutti i pazienti portatori di nevi, per la mancanza di chiari criteri di inclusione e di esclusione delle lesioni da analizzare. Anche se non si può generalizzare, la fotografia *total body* può essere utile in pazienti con sindrome del nevo atipico durante il *follow-up* clinico.

BIBLIOGRAFIA

1. Geller AC, Swetter SM, Brooks K, Demierre MF, Yaroch AL. Screening, early detection, and trends for melanoma: current status (2000-2006) and future directions. *J Am Acad Dermatol 2007 Oct; 57(4):555-72*
2. Bafounta ML, Beauchet A, Aegerter P, Saiag P. Is dermoscopy (epiluminescence microscopy) useful for the diagnosis of melanoma? Results of a meta-analysis using techniques adapted to the evaluation of diagnostic test. *Arch Dermatol 2001; 137:1343-50*
3. Kittler K, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncol 2002; 3:159-65*
4. Consiglio Nazionale delle Ricerche. Basi scientifiche per la definizione di linee guida in ambito clinico per il Melanoma Cutaneo. *CNR - Roma, 2000*
5. Testori A, Stanganelli I, Della Grazia L, Mahadavan L. Diagnosis of melanoma in the elderly and surgical implications. *Surg Oncol 2004 Dec; 13(4):211-21. Review*
6. Kelly JW, Chamberlain AJ, Staples MP, McAvoy B. Nodular melanoma. No longer as simple as ABC. *Aust Fam Physician 2003; 32(9):706-9*
7. Carli P, Massi D, Santucci M, Biggeri A, Giannotti B. Cutaneous melanoma histologically associated with a nevus and melanoma de novo have a different profile of risk: results from a case-control study. *J Am Acad Dermatol. 1999 Apr; 40(4):549-57*
8. Bristow IR, de Berker DA, Acland KM, Turner RJ, Bowling J. Clinical guidelines for the recognition of melanoma of the foot and nail unit. *J Foot Ankle Res 2010 Nov 1; 3:25*
9. De Giorgi V, Aricò M, Lotti T. Il melanoma. Prevenzione, diagnosi e terapia. *Editoriale Fernando Folini, Tortona (AL) 2008*
10. De Giorgi V, Saggini A, Grazzini M, Gori A, Rossari S, Scarfì F, Verdelli A, Chimenti S, Lotti T, Massi D. Specific challenges in the management of subungual melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther 2011 May; 11(5):749-61*
11. Moloney FJ, Menzies SW. Key points in the dermoscopic diagnosis of hypomelanotic melanoma and nodular melanoma. *Journal of Dermatology 2011; 38:10-5*
12. Pizzichetta MA, Talamini R, Stanganelli I, Puddu P, Bono R, Argenziano G, Veronesi A, Trevisan G, Rabinovitz H, Soyer HP. Amelanotic/hypomelanotic melanoma: clinical and dermoscopic features. *Br J Dermatol 2004 Jun; 150(6):1117-24*
13. Adler MJ, White CR. Amelanotic Malignant Melanoma. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery 1997 June; 16(2):122-30*
14. Gualandri L, Betti R, Crosti C. Clinical features of 36 cases of amelanotic melanomas and considerations about the relationship

between histologic subtypes and diagnostic delay. *J Eur Acad Dermatol Venereol 2009 Mar; 23(3):283-7*

15. Carli P, De Giorgi V, Chiarugi A, Nardini P, Weinstock MA, Crocetti E, Stante M, Giannotti B. Addition of dermoscopy to conventional naked-eye examination in melanoma screening: a randomized study. *J Am Acad Dermatol 2004; 50:683-9*
16. Pizzichetta MA, Stanganelli I, Bono R, Soyer HP, Magi S, Canzonieri V, Lanzanova G, Annessi G, Massone C, Cerroni L, Talamini R; Italian Melanoma Intergroup (IMI). Dermoscopic features of difficult melanoma. *Dermatol Surg 2007 Jan; 33(1):91-9*
17. Peris K, Ferrari A, Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S. Dermoscopic classification of Spitz/Reed nevi. *Clin Dermatol 2002 May-Jun; 20(3):259-62*
18. Vestergaard ME, Macaskill P, Holt PE, Menzies SW. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. *Br J Dermatol 2008 Sep; 159(3):669-76. Epub 2008 Jul 4*
19. De Giorgi V, Grazzini M, Rossari S, Gori A, Alfaioli B, Papi F, Savarese I, Cervadoro E, Lotti T. Adding dermatoscopy to naked eye examination of equivocal melanocytic skin lesions: effect on intention to excise by general dermatologists. *Clin Exp Dermatol 2011 Apr; 36(3):255-9. doi: 10.1111/j.1365-2230.2010.03963.x. Epub 2010 Nov 22*
20. Pehamberger H, Steiner A, Wolff K. In vivo epiluminescence microscopy of pigmented skin lesions. I. Pattern analysis of pigmented skin lesions. *J Am Acad Dermatol 1987; 17:571-83*
21. Nachbar F, Stolz W, Merkle T, Cognetta AB, Vogt T, Landthaler M, Bilek P, Braun-Falco O, Plewig G. The ABCD rule of dermatoscopy. High prospective value in the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. *J Am Acad Dermatol 1994 Apr; 30(4):551-9*
22. Menzies SW, Ingvar C, Crotty KA, McCarthy WH. Frequency and morphologic characteristics of invasive melanoma lacking specific surface microscopic features. *Arch Dermatol 1996 Oct; 132(10):1178-82*
23. Argenziano G, Fabbrocini G, Carli P, De Giorgi V, Sammarco E, Delfino M. Epiluminescence microscopy for the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. Comparison of the ABCD rule of dermatoscopy and a new 7-point checklist based on pattern analysis. *Arch Dermatol 1998 Dec; 134(12):1563-70*
24. Stolz W, Landthaler M. Classification, diagnosis and differential diagnosis of malignant melanoma. *Chirurg 1994 Mar; 65(3):145-52. Review. German*
25. Ascierto PA, Palmieri G, Botti G, Satriano RA, Stanganelli I, Bono R, Testori A, Bosco L, Daponte A, Caracò C, Chiofalo MG, Melucci MT, Calignano R, Tatangelo F, Cochran AJ, Castello G; Melanoma Cooperative Group. Early diagnosis of malignant melanoma: Proposal

of a working formulation for the management of cutaneous pigmented lesions from the Melanoma Cooperative Group. *Int J Oncol 2003 Jun; 22(6):1209-15*

26. Henning JS, Dusza SW, Wang SQ, Marghoob AA, Rabinovitz HS, Polsky D, Kopf AW. The CASH (color, architecture, symmetry, and homogeneity) algorithm for dermoscopy. *J Am Acad Dermatol 2007 Jan; 56(1):45-52*
27. Soyer HP, Argenziano G, Zalaudek I, Corona R, Sera F, Talamini R, Barbato F, Baroni A, Cicale L, Di Stefani A, Farro P, Rossiello L, Ruocco E, Chimenti S. Three-point checklist of dermoscopy. A new screening method for early detection of melanoma. *Dermatology 2004; 208(1):27-31*
28. Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S, Talamini R, Corona R, Sera F, Binder M, Cerroni L, De Rosa G, Ferrara G, Hofmann-Wellenhof R, Landthaler M, Menzies SW, Pehamberger H, Piccolo D, Rabinovitz HS, Schiffner R, Staibano S, Stolz W, Bartenjev I, Blum A, Braun R, Cabo H, Carli P, De Giorgi V, Fleming MG, Grichnik JM, Grin CM, Halpern AC, Johr R, Katz B, Kenet RO, Kittler H, Kreusch J, Malvehy J, Mazzocchetti G, Oliviero M, Ozdemir F, Peris K, Perotti R, Perusquia A, Pizzichetta MA, Puig S, Rao B, Rubegni P, Saida T, Scalvenzi M, Seidenari S, Stanganelli I, Tanaka M, Westerhoff K, Wolf IH, Braun-Falco O, Kerl H, Nishikawa T, Wolff K, Kopf AW. Dermoscopy of pigmented skin lesions: results of a consensus meeting via the Internet. *J Am Acad Dermatol 2003 May; 48(5):679-93. Review*
29. Chimenti S, Argenziano G, Di Stefani A, Andreassi L, Carli P, De Giorgi V, Ferrara G, Ferrari A, Gasparini S, Giovene GL, Lomuto M, Mazzocchetti G, Pellacani G, Pellicano R, Peris K, Piccolo D, Pizzichetta MA, Rubegni P, Scalvenzi M, Seidenari S, Serresi S, Stanganelli I, Giannotti B. Guidelines in dermoscopy. *G Ital Dermatol Venereol 2005 Aug; 140:329-47*
30. Bowling J, Argenziano G, Azenha A, Bandic J, Bergman R, Blum A, Cabo H, Di Stephani A, Grichnik J, Halpern A, Hofman-Wellenhof R, Johr R, Kittler H, Kopf A, Kreusch J, Langford D, Malvehy J, Marghoob A, Menzies S, Ozdemir F, Peris K, Piccolo D, Pizzichetta MA, Polsky D, Puig S, Rabinovitz H, Rubegni P, Saida T, Scalvenzi M, Seidenari S, Soyer HP, Tanaka M, Zalaudek I, Braun RP. Dermoscopy key points: recommendations from the international dermoscopy society. *Dermatology 2007; 214(1):3-5*
31. Skvara H, Teban L, Fiebiger M, Binder M, Kittler H. Limitations of dermoscopy in the recognition of melanoma. *Arch Dermatol 2005 Feb; 141(2):155-60*
32. Carli P, Ghigliotti G, Gnone M, Chiarugi A, Crocetti E, Astorino S, Berti UA, Broganelli P, Carcaterra A, Corradin MT, Pellacani G, Piccolo D, Risulo M, Stanganelli I, De Giorgi V. Baseline factors

influencing decisions on digital follow-up of melanocytic lesions in daily practice: an Italian multicenter survey. *J Am Acad Dermatol 2006 Aug; 55(2):256-62. Epub 2006 Jun 12*

33. Salerni G, Carrera C, Lovatto L, Puig-Butille JA, Badenas C, Plana E, Puig S, Malvehy J. Benefits of total body photography and digital dermatoscopy ("two-step method of digital follow-up") in the early diagnosis of melanoma in patients at high risk for melanoma. *J Am Acad Dermatol 2011 Jun 15*
34. Feit NE, Dusza SW, Marghoob AA. Melanomas detected with the aid of total cutaneous photography. *Br J Dermatol 2004; 150(4):706-14*
35. Wang SQ, Hashemi P. Non invasive imaging technologies in the diagnosis of melanoma. *Sem Cutan Med Surg 2010; 29:174-84*
36. Scope A, Benvenuto-Andrade C, Agero AL et al. In vivo reflectance confocal microscopy imaging of melanocytic skin lesions: consensus terminology glossary and illustrative images, *J Am Acad Dermatol 2007 Oct;57(4):644-58. Epub 2007 Jul 16*
37. Pellacani G, Guitera P, Longo C, Avramidis M, Seidenari S, Menzies S. The impact of in vivo reflectance confocal microscopy for the diagnostic accuracy of melanoma and equivocal melanocytic lesions. *J Invest Dermatol 2007 Dec; 127(12):2759-65*
38. Guitera P, Pellacani G, Longo C, Seidenari S, Avramidis M, Menzies SW. In vivo reflectance confocal microscopy enhances secondary evaluation of melanocytic lesions. *J Invest Dermatol 2009 Jan; 129 (1):131-8*
39. Segura S, Puig S, Carrera C, Palou J, Malvehy J. Development of a two-step method for the diagnosis of melanoma by reflectance confocal microscopy. *JAAD 2009 Aug; 61(2):216-29*

6.0 PREVENZIONE SECONDARIA

6.1 Valore dell'esame clinico generale
6.2 Identificazione di un sospetto melanoma
6.3 Importanza dell'autoesame
6.4 Ruolo del Medico di Medicina Generale
6.5 Ruolo centrale del dermatologo nella diagnosi precoce
6.6 Impatto degli *screening* nella prevenzione secondaria
6.7 Campagne di educazione sanitaria
6.8 Informazione via *Internet*
6.9 Monitoraggio dei pazienti a rischio

Il melanoma rappresenta un importante problema di salute pubblica con un aumento di incidenza del 3-8% l'anno, nella maggior parte degli individui bianchi di origine europea (vedi cap. 1.0). Negli ultimi anni, la strategia clinica per l'identificazione e la diagnosi precoce del melanoma (vedi cap. 5.0) ha registrato notevoli impulsi, grazie alla migliore comprensione dei *pattern* di riconoscimento, all'implementazione della dermatoscopia nella pratica dermatologica ed all'impatto che le attività di educazione sanitaria e di *screening* selettivo hanno avuto nelle popolazioni caucasiche, in particolare in Australia, Stati Uniti ed Unione Europea. Queste misure hanno determinato un sostanziale miglioramento del tasso di sopravvivenza, riconducibile ad una significativa riduzione dello spessore medio del melanoma alla diagnosi.

6.1 Valore dell'esame clinico generale

L'esame visivo della pelle è il metodo di *screening* più comunemente utilizzato per sensibilizzare non solo i medici, ma anche la popolazione nella prevenzione secondaria (1,2). Dei 5 tumori maggiormente "percepibili" (melanoma, mammella, colon-retto, prostata e cervice uterina), solo il melanoma non richiede valutazioni tecnologiche. L'utilizzo di un esame clinico integrale completo è fondamentale per evitare di "dimenticare" un melanoma in sede. Infatti, la maggior parte dei melanomi si trova in aree generalmente coperte da indumenti. I dati della letteratura hanno rilevato che casi di melanoma sono stati

identificati con una proporzione significativamente più alta nei pazienti valutati con un esame completo della pelle rispetto ai pazienti che avevano eseguito solo una visita parziale. Inoltre, è fondamentale che la visita avvenga in condizioni ottimali di illuminazione. E' stato dimostrato come la visita dermatologica abbia sensibilità e specificità relativamente alte. In uno studio effettuato nel Queensland (3), l'esame completo della superficie cutanea raggiungeva una specificità dell'86%, che può essere comparata a quella ottenuta dai programmi di *screening* nel carcinoma della mammella, nel carcinoma del colon-retto e nel carcinoma prostatico. Pertanto, si raccomanda ai dermatologi di eseguire un esame integrale di tutto l'ambito cutaneo per identificare lesioni sospette, in particolare durante le consulenze richieste per altri motivi. Tuttavia, anche in Paesi come gli Stati Uniti, dove le raccomandazioni sulla prevenzione sono elevate, solo il 30% dei dermatologi esegue routinariamente una visita integrale della pelle a tutti i pazienti (4). Inoltre, i pazienti che più frequentemente si sottopongono ad un esame di *screening* della cute sono quelli con cute fotosensibile, di livello culturale più alto e con maggiore consapevolezza dei rischi legati all'esposizione solare ed ai tumori cutanei, mentre il sottogruppo di popolazione rappresentato da maschi, ultracinquantenni e di livello socio-economico basso non si sottopone routinariamente all'esame completo della cute e la diagnosi è spesso tardiva (5,6).

6.2 Identificazione di un sospetto melanoma

I principali indicatori clinici per l'identificazione del melanoma sono la regola dell'**ABCDE** ed il segno del "brutto anatroccolo" (1,2). Da molti anni, la regola dell'**ABCDE** (**A**simmetria, **B**ordi irregolari, **C**olore disomogeneo, **D**imensioni > 6 mm, **E**voluzione rapida) rappresenta uno strumento didattico di riconoscimento semplice, che permette di sensibilizzare la popolazione ed i medici nella diagnosi precoce del melanoma (Tabella 1).

Tabella 1 Regola dell'ABCDE per la diagnosi del sospetto melanoma

	**A** come **A**simmetria della lesione
	**B** come **B**ordi irregolari e frastagliati a "carta geografica"
	**C** come **C**olore disomogeneo a varie tinte (nero, rosso-bruno, rosa non uniforme) o nero molto intenso
	**D** come **D**imensioni > 6 mm
	**E** come **E**voluzione progressiva; la lesione tende a crescere e ad allargarsi rapidamente con modifiche cromatiche

Recentemente, la revisione della letteratura ha fortemente enfatizzato l'importanza della E per migliorare la diagnosi (7).
La regola dell'ABCDE fornisce sicuramente un aiuto importante nell'identificazione del melanoma, soprattutto per i medici con minor esperienza in campo dermato-oncologico. Tuttavia, la regola clinica dell'ABCD ha una bassa sensibilità per le lesioni piccole, amelanotiche e porta all'escissione di molte lesioni benigne nei pazienti con numerosi nevi displastici (8).
Oltre ai melanomi piccoli ed iniziali, anche il melanoma nodulare può sfuggire alla regola dell'ABCD. Quest'ultimo rappresenta il 10-30% di tutti i melanomi, il 40-50% di quelli di spessore > 2 mm e nel 50%

circa dei casi si presenta melanotico (9). Il melanoma nodulare rappresenta lo "zoccolo duro" della diagnostica melanocitaria, in quanto si presenta come un nodulo rilevato, simmetrico, dai bordi regolari e solitamente caratterizzato da un solo colore (10,11).
La diagnosi precoce del melanoma nodulare è fondamentale, considerando che questa forma ha un comportamento biologico aggressivo ed una prognosi infausta. Quindi, nel melanoma nodulare, specialmente negli anziani, i parametri di valutazione cambiano e sono rappresentati dagli acronimi EFG (*Elevated*, elevazione; *Firm*, consistenza dura; *Growing progressively*, a rapida crescita) (10) e 3C (*irregular Color, Contourn and Change*) (12).
Tuttavia, l'accuratezza diagnostica dei criteri EFG non è ancora conosciuta. Un altro indicatore clinico utilizzato per il riconoscimento dei melanomi è il segno del "brutto anatroccolo" (13). Il segno del "brutto anatroccolo" ha una buona sensibilità (0,85), specificità (0,83) ed accuratezza diagnostica (0,87) per la diagnosi del melanoma (14).
La sua identificazione è correlata al fatto che in un determinato individuo i nevi generalmente hanno le medesime caratteristiche. Il "brutto anatroccolo" è un nevo con caratteristiche diverse dagli altri nevi e, pertanto, la possibilità che sia un potenziale melanoma è alta.
L'analisi effettuata dai dermatologi si basa più sulla irregolarità complessiva, sul segno del "brutto anatroccolo" e sulle modifiche riferite dal paziente, piuttosto che sull'applicazione di algoritmi ben conosciuti, come la regola dell'ABCD (11,13).

6.3 Importanza dell'autoesame

L'autoesame da parte del paziente o con l'aiuto dei familiari o con l'uso di due specchi permette di diagnosticare la maggior parte dei melanomi ed è considerato un fattore predittivo per il melanoma con spessore sottile (2). Va sottolineato che l'autoesame deve includere le pieghe interdigitali ed il cuoio capelluto. Ma quanti e quali pazienti praticano regolarmente l'autoesame? Circa la metà di tutti i melanomi sono diagnosticati dai pazienti e si presentano con una lesione di recente insorgenza o che cambia (15). I pazienti che si sottopongono particolarmente all'autoesame sono caratterizzati da livello culturale più elevato, storia familiare di tumore, precedenti visite mediche e pregressa asportazione di melanoma o di nevo melanocitico. Scarse invece sono le risposte da parte di sottogruppi

di popolazione come gli anziani, i soggetti di basso livello socio-economico ed i disoccupati (16). Nella popolazione che esegue l'autoesame, pochi lo effettuano in maniera completa. La difficoltà dell'autoesame può essere anche collegata al numero ed alla caratteristica dei nevi del paziente. Anche in assenza di parametri clinici sospetti per melanoma, la storia di cambiamento della lesione, in particolare l'aumento di dimensioni, di forma, di colore e la trasformazione da una lesione piana ad una papulo-nodulare sono elementi che portano i pazienti a consultare un dermatologo (6,17-19).
Nella popolazione italiana, il riconoscimento di un melanoma è prevalente nella popolazione giovanile, di sesso femminile, sensibilizzata ad applicare l'ABCD e con tendenza ad effettuare l'autoesame (17).

6.4 Ruolo del Medico di Medicina Generale

Il medico di medicina generale (MMG) ha un ruolo importante nel percorso diagnostico delle lesioni melanocitarie e rappresenta il naturale interlocutore tra i pazienti e le strutture specialistiche di riferimento. Tale coinvolgimento è di estrema importanza per indirizzare i pazienti realmente a rischio di melanoma, evitando l'afflusso indiscriminato agli ambulatori specialistici e fungendo quindi da primo filtro. Infatti, nella maggior parte dei casi, il paziente con nevi multipli o con una neoformazione potenzialmente sospetta richiede il primo consulto al proprio MMG. Allo stesso modo, un "nevo a rischio" potrebbe essere identificato dal MMG nel corso di una visita generale, fatta per altri motivi (2,20). Inoltre, anche nell'ambito della medicina generale è necessaria un'adeguata attenzione per la presenza di un nodulo a rapido accrescimento che può nascondere un potenziale melanoma nodulare, il cui quadro clinico può essere riassunto con l'acronimo EFG (*Elevated*, elevazione; *Firm*, consistenza dura; *Growing progressively*, a rapida crescita) (10,20). Per tale motivo, è opportuno che il MMG sia adeguatamente addestrato, pur nella complessità della patologia melanocitaria, sui caratteri generali per il riconoscimento di una lesione sospetta, per la selezione dei pazienti a rischio e per il supporto educazionale alla prevenzione primaria, in particolare in età pediatrica. In Italia, sono numerose le esperienze di formazione dei medici di famiglia con Corsi specifici, anche con l'utilizzo di sistemi multimediali (19). Il dermatologo ha un ruolo importante in quasi tutti i Paesi dell'Unione Europea, Stati Uniti ed Australia nella formazione

dei medici di famiglia. I programmi di *training* effettuati hanno riportato un miglioramento della specificità ed una migliore accuratezza della diagnosi di melanoma (2).
Pertanto, bisogna sempre incoraggiare l'uso della regola dell'ABCDE, della *7-point checklist* (21) e del segno del "brutto anatroccolo" ai MMG adeguatamente formati, anche con l'appoggio dell'Ordine dei Medici e degli Assessorati regionali alla Sanità (Tabella 2).
Accanto a questo essenziale momento dovranno essere sviluppate iniziative atte ad inserire i medici di famiglia in una struttura polifunzionale "a rete", che comprenda tanto i servizi territoriali quanto quelli specialistici od ultra- specialistici: un'unica metodologia diagnostica ed un preciso protocollo terapeutico e di *follow-up* dovranno essere condivisi tra tutti i componenti la rete.
Tali protocolli ed i relativi flussi di richieste di prestazioni dovranno essere portati a conoscenza di tutti i cittadini utilizzando ogni strumento utile, ma valorizzando e supportando ancora una volta, in particolare, i medici di famiglia in quanto primo contatto della "rete" con tutti gli utenti. Un'adeguata rete funzionale ed un'efficiente educazione dei cittadini potranno aumentare considerevolmente l'appropriatezza degli invii.

Tabella 2 Parametri clinici e morfologici di una lesione sospetta per l'invio allo specialista

Nevo con significative ed evidenti variazioni di forma, colore e dimensione dopo la pubertà
Nevo presente dalla nascita (congenito) che cambia forma, colore e dimensione
Qualsiasi nevo che presenta tre o più colori o che ha perso la sua simmetria
Un nevo associato a prurito o che presenta, spontaneamente, un sanguinamento
Ogni lesione pigmentata od acromica della cute in accrescimento
Ogni lesione della cute la cui diagnosi non sia certa, in quanto mostra caratteristiche cliniche e/o dermoscopiche di aspecificità, specialmente se di recente insorgenza in un individuo adulto
Un nevo che si differenzia per colore (nero o rosso) o per altre caratteristiche morfologiche, in soggetti con numerosi nevi caratterizzati da una morfologia sovrapponibile
Una nuova banda pigmentata in un'unghia, specialmente se associata ad un danno della stessa (onicodistrofia)
Una lesione subungueale in accrescimento

6.5 Ruolo centrale del dermatologo nella diagnosi precoce

I medici, in particolare i dermatologi, identificano il melanoma ad uno stadio più precoce rispetto ai pazienti stessi, ai coniugi, ai familiari o agli amici. Infatti, i melanomi identificati durante visite specialistiche presentano uno spessore di Breslow più basso rispetto a quelli diagnosticati in altre occasioni (22,23). Comunque, l'aumentata incidenza di lesioni sottili non sembra correlare ad una riduzione della diagnosi di melanomi spessi (15,24).
L'avvento della dermoscopia nella pratica clinica dermatologica ha migliorato l'approccio diagnostico del melanoma, ha permesso la riduzione del tasso di biopsie "inutili" e facilitato la diagnostica differenziale delle lesioni melanocitarie e non melanocitarie (25-28) (vedi cap. 5.0). La dermoscopia non può essere considerata un esame di secondo livello: risultati recenti sottolineano l'importanza della stretta correlazione tra l'esame clinico (ad occhio nudo) e la dermoscopia. Nella pratica dermatologica è essenziale ragionare applicando sempre la sinopsi diagnostica anamnestica, clinica e dermatoscopica. La combinazione tra le due procedure combinate, clinica e dermoscopia, abbassa il rischio del melanoma falso negativo (29).
Lo studio META (*MElanoma TAsk force*) ha evidenziato l'importanza del ruolo del dermatologo negli ambulatori specializzati, i quali hanno una presenza intra-ospedaliera pari al 65%, sottolineando che la loro attività diagnostica si basa su una valutazione clinica generale ad occhio nudo, integrata dall'esame dermoscopico (in corso di pubblicazione).

6.6 Impatto degli *screening* nella prevenzione secondaria

Il *gold standard*, per evidenziare i benefici dello *screening*, è dato da studi prospettici randomizzati su larga scala, che evidenziano un calo della mortalità legata al tumore, considerato nelle popolazioni a cui si è effettuato lo *screening* rispetto a quelle senza (30).
Per il melanoma non ci sono studi simili completi (22). In generale, la bassa prevalenza di mortalità e gli alti costi di allestimento dello studio non raccomandano lo *screening* di massa per la prevenzione del melanoma (31,32). Pertanto, i percorsi diagnostici di prevenzione secondaria sviluppati nel corso degli ultimi decenni hanno avuto caratteristiche e modalità differenti. In particolare, sono stati implementati *screening* guidati da dermatologi e medici non

dermatologi, con campagne di educazione mirate ai pazienti ed alla popolazione ad alto rischio di malattia (2). In Italia, rispondono maggiormente alle iniziative di *screening* i pazienti già sensibilizzati da visite precedenti, con fattori di rischio e, in particolare, con anamnesi personale o familiare positiva a tumori cutanei (6).

6.7 Campagne di educazione sanitaria

Programmi educazionali su larga scala sono presenti in molte comunità soprattutto dell'Australia, Stati Uniti ed Unione Europea. L'*American Academy Dermatology* (AAD) *National Skin Cancer Screening Program* ha condotto nel periodo 1992-1994 una campagna di prevenzione primaria e secondaria nei 50 Stati. Tra i quasi 250.000 pazienti, sono stati diagnosticati 363 melanomi; 98% erano melanomi di stadio I (33). Nelle articolate campagne di educazione sanitaria condotte in alcune aree dell'Inghilterra e della Scozia è stato osservato un aumento del numero dei melanomi diagnosticati in seguito alla campagna di educazione (34). Si è registrata una crescita dei melanomi sottili, ma l'incidenza dei melanomi spessi non ha mostrato alcun calo, così come confermato da uno studio condotto nel Queensland (15). Nella stessa area, un'analisi dei tassi di mortalità del melanoma dal 1950 al 2002 non ha mostrato alcun calo nella mortalità cumulativa, soprattutto nel *range* di età 55-79 anni (30). In Inghilterra ed in Scozia un'analisi dei tassi di mortalità del melanoma dal 1981 al 1996 non ha evidenziato alcun calo nella mortalità cumulativa nelle aree di intervento rispetto alle aree senza interventi educazionali (35). Il 65% dei dermatologi belgi ha partecipato alla campagna *Melanoma Monday*. Nel corso di questa campagna sono stati rilevati 25 melanomi su 2.767 individui (36).
Da molti anni, in Italia, sono state pianificate campagne di educazione sanitaria che hanno fatto registrare un aumento del numero di melanomi diagnosticati in fase precoce, a prognosi favorevole e con una documentata riduzione di mortalità rispetto alle aree in cui non sono state mai organizzate campagne educazionali (37,38), tuttavia l'analisi dei dati a lungo termine non ha confermato questo *trend* (39).
In una campagna di diagnosi precoce del melanoma effettuata a Padova, Rossi et al. (40) hanno identificato 13 melanomi su 2.050 individui, ma nel 92% si trattava di forme sottili con spessore di Breslow < 1,50 mm. Dalle campagne di educazione sanitaria organizzate generalmente a livello provinciale, di durata settimanale o mensile, e con una

complessa organizzazione multidisciplinare si è passati a campagne a carattere nazionale, anche se con risultati epidemiologici non facilmente rilevabili. I risultati pubblicati dello *Skin Cancer Day* hanno rilevato 3 melanomi tra più di 1.000 pazienti visitati durante la campagna promozionale di prevenzione in 4 Centri dermatologici (18). Tuttavia, l'impostazione di questa giornata di informazione, associata a visita specialistica con libero accesso da parte della popolazione e senza adeguato controllo e filtro da parte del MMG, è stata oggetto di dibattiti e critiche in ambito clinico-epidemiologico (6). Recentemente, la Società Italiana di Dermatologia medica, chirurgica, estetica e delle Malattie Sessualmente Trasmesse (SIDeMaST) ha aderito all'*Euromelanoma day*, che si tiene nel mese di maggio in quasi tutte le Nazioni europee, della durata di un giorno e che prevede, sullo stesso modello dello *Skin Cancer Day*, una campagna di informazione sulla diagnosi precoce del melanoma e sui rischi di una scorretta esposizione solare. In alcuni Centri dermatologici, è stato possibile eseguire nella stessa giornata anche una visita dermatologica. Allo stesso modo, con "Metti il melanoma in fuori gioco" l'Intergruppo Melanoma Italiano (IMI) ha programmato attività educazionali sulla prevenzione e sulla ricerca del melanoma così come l'Associazione Dermatologi Ospedalieri Italiani (ADOI). Le campagne di educazione sanitaria rappresentano uno strumento importante per mantenere un livello di attenzione sulla diagnosi precoce e sulla fotoprotezione, anche se sarebbe importante focalizzare il messaggio maggiormente ai sottogruppi di popolazione che rispondono poco alle iniziative educazionali. Va considerato il numero crescente di immigrati, a cui sono rivolti i messaggi informativi multilingua, in arabo-inglese, arabo-francese ed albanese, realizzati da parte della *Mediterrraen Task Force for Cancer Control* (www.cinbo.org).

6.8 Informazione via *Internet*

In quest'epoca di globalizzazione, numerose Organizzazioni e Fondazioni hanno lanciato siti *web* contenenti fotografie di lesioni normali ed atipiche e le tecniche per eseguire correttamente l'autoesame. In Italia, quasi tutte le Organizzazioni dermatologiche forniscono informazioni sulla prevenzione primaria e secondaria. Tuttavia, è stato riscontrato che la maggior parte dei siti *web*, in lingua inglese, non è riuscita

ad includere un'informazione completa riguardo ad aspetti generali, fattori di rischio, diagnosi, trattamento, prevenzione e prognosi del melanoma. Le informazioni mediche, ricercando il termine melanoma, presentano lacune riguardo alle informazioni generali e contengono anche dati inesatti. Per questo motivo, è importante che anche gli operatori sanitari, ed i dermatologi in particolare, forniscano ai pazienti adeguati informazioni sul corretto uso della RETE. In Italia, sono presenti consigli per la prevenzione primaria e secondaria nei siti *web* delle maggiori organizzazioni dermatologiche nazionali (SIDeMaST, ADOI, SIDCO), della Lega Nazionale Tumori, dell'Associazione Italiana Ricerca sul Cancro e nel sito multidisciplinare dell'Intergruppo Melanoma Italiano. Inoltre, si suggerisce il sito del *Melanoma Molecular Map Project,* www.mmmp.org, che raccoglie tutte le informazioni scientifiche con le più recenti pubblicazioni sul melanoma.

6.9 Monitoraggio dei pazienti a rischio

I dati epidemiologici suggeriscono uno *screening* selettivo di specifici sottogruppi di popolazione (vedi cap. 1.0). In particolare, necessitano di un monitoraggio cutaneo specialistico i soggetti che presentano una o più delle seguenti caratteristiche: familiarità per melanoma, anamnesi personale di melanoma, melanomi multipli, foto-tipo 1 e 2 secondo Fitzpatrick, lentigginosi, alto numero di nevi comuni (> 40), presenza di nevi atipici (> 3), anamnesi personale di carcinomi (ad esempio epiteliomi) e/o cheratosi attiniche e soggetti che presentano nevi con parametri ABCDE del melanoma (41,42). Particolare attenzione deve essere rivolta ai soggetti che presentano un importante aumento del rischio di melanoma (più di 10 volte rispetto alla popolazione generale), come i soggetti con nevi melanocitici congeniti giganti e pelosi (> 20 cm di diametro e nevi che ricoprono il 5% della superficie corporea) ed i soggetti con una forte ereditarietà familiare di melanoma. In particolare, quando la presenza di 1 dei 2 membri affetti da melanoma si associa a sindrome del nevo atipico e/o melanomi multipli (21). Inoltre, specialmente in Europa e Nord America, le famiglie ad alto rischio di melanoma possono anche presentare un rischio più elevato di cancro al pancreas (21). In questi casi, si consiglia un *counseling* genetico presso Centri di riferimento (http://www.genomel.org) (43).

Le raccomandazioni per lo *screening* e la vigilanza degli individui a rischio sono riassunte in Tabella 3.

Tabella 3 Siete un soggetto a rischio di melanoma?

Nessun rischio particolare
La pelle si abbronza facilmente e tollera bene il sole Assenza di nei Presenza di qualche nevo regolare che è rimasto inalterato **Indicazioni: Autoesame e controllo dal MMG al bisogno**
Rischio Basso*
Scottature durante l'infanzia e l'adolescenza Lentigginosi diffusa Nevi melanocitici comuni (> 40) Nevi melanocitici atipici (> 3) Storia familiare di melanoma Storia personale di carcinomi e/o cheratosi attiniche Pazienti trapiantati **Indicazioni: Autoesame e controllo dermatologico 1-2 anni**
Rischio Moderato*
Melanoma familiare (2 membri di primo grado affetti da melanoma) Pregresso melanoma Melanomi Multipli Sindrome nevo atipico (o > 100 nevi melanocitici) **Indicazioni: Autoesame e controllo dermatologico programmato**
Rischio alto
Nevo di diametro > 6 mm che si modifica per forma e/o colore Nevo insorto in età adulta e che si modifica Neoformazione nodulare, simmetrica, dura a rapido accrescimento **Indicazioni: Consultare in tempi rapidi il dermatologo**

Modificato da Consiglio Nazionale delle Ricerche. Basi scientifiche per la definizione di linee guida in ambito clinico per il Melanoma Cutaneo. CNR - edizione 2000
* Il rischio relativo aumenta con l'associazione dei diversi cofattori
** In presenza dei tre cofattori è anche indicato un *counseling* genetico

In conclusione, le campagne di informazione sulla prevenzione primaria, in particolare per quanto riguarda una corretta fotoprotezione, soprattutto in età infantile ed adolescenziale, così come le regole per identificare una lesione potenzialmente sospetta, devono essere generalizzate in accordo con il codice europeo contro il cancro sottoscritto dai Paesi dell'Unione, inclusa l'Italia.
L'importanza della diagnosi precoce del melanoma e l'adeguato trattamento sono fondamentali ai fini di migliorare la prognosi di questo aggressivo tumore cutaneo. Pertanto, la popolazione dovrebbe essere sensibilizzata, mediante campagne educazionali, a riconoscere le lesioni sospette attraverso la regola dell'ABCDE, ad eseguire con metodo e regolarità l'autoesame ed a consultare il medico per le lesioni sospette. Allo stesso modo, alcune categorie professionali come insegnanti, infermieri, fisioterapisti, estetisti, parrucchieri e farmacisti dovrebbero rientrare nel circuito virtuoso della sensibilizzazione sanitaria.
Lo *screening* selettivo è indicato solo per individui ad alto rischio con le seguenti caratteristiche: uomini con più di 50 anni, familiarità per melanoma, storia personale di melanoma, melanomi multipli, pazienti con tumori cutanei non melanocitici (carcinomi e cheratosi attiniche), basso livello socio-economico, elevato numero di nevi melanocitici comuni e/o atipici, foto-tipo I/II, occhi azzurro/verdi, capelli biondo/rossi.
Il riconoscimento clinico della lesione sospetta e l'identificazione dei pazienti a rischio per un monitoraggio periodico presso il Centro di riferimento specialistico rimangono i punti fermi per la diagnosi precoce.

BIBLIOGRAFIA

1. Consiglio Nazionale delle Ricerche. Basi scientifiche per la definizione di linee guida in ambito clinico per il Melanoma Cutaneo. *CNR - Roma, 2000*
2. Geller AC, Swetter SM, Brooks K, Demierre MF, Yaroch AL. Screening, early detection, and trends for melanoma: current status (2000-2006) and future directions. *J Am Acad Dermatol 2007 Oct; 57(4):555-72; quiz 573-6*
3. Aitken JF, Janda M, Elwood M, Youl PH, Ring IT, Lowe JB. Clinical outcomes from skin screening clinics within a community-based melanoma screening program. *J Am Acad Dermatol 2006; 54(1):105-14*

4. Federman DG, Kravetz JD, Kirsner RS. Skin cancer screening by dermatologists: prevalence and barriers. *J Am Acad Dermatol 2002 May; 46(5):710-4*
5. Youl PH, Janda M, Elwood M, Lowe JB, Ring IT, Aitken JF. Who attends skin cancer clinics within a randomized melanoma screening program? *Cancer Detect Prev 2006; 30(1):44-51*
6. De Giorgi V, Gori A, Alfaioli B, Rossari S, Grazzini M, Pata MA, Moretti S, Lotti T. Early diagnosis for melanoma: is open access to skin cancer clinics really significant? A prospective study. *Prev Med 2010; 51(3-4):334-5*
7. Abbasi NR, Shaw HM, Rigel DS, Friedman RJ, McCarthy WH, Osman I et al. Early diagnosis of cutaneous melanoma; revisiting the ABCD criteria. *JAMA 2004; 292:2771-6*
8. Grant-Kels JM, Bason ET, Grin CM. The misdiagnosis of malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol 1999 Apr; 40(4):539-48*
9. Shaikh WR, Xiong M, Weinstock MA.The Contribution of Nodular Subtype to Melanoma Mortality in the United States, 1978 to 2007. *Arch Dermatol 2011 Sept 19 [Epub ahead of print]*
10. Carli P, De Giorgi V, Palli D, Maurichi A, Mulas P, Orlandi C, Imberti G, Stanganelli I, Soma P, Dioguardi D, Catricalá C, Betti R, Paoli S, Bottoni U, Lo Scocco G, Scalvenzi M, Giannotti B. Patterns of detection of superficial spreading and nodular-type melanoma: a multicenter Italian study. *Dermatol Surg 2004 Nov; 30(11):1371-5; discussion 1375-6*
11. Gachon J, Beaulieu P, Sei JF, Gouvernet J, Claudel JP, Lemaitre M, Richard MA et al. First prospective study of the recognition process of melanoma in dermatological practice. *Arch Dermatol 2005; 141:434-8*
12. Moynihan GD. The 3 Cs of melanoma: time for a change? *J Am Acad Dermatol 1994 Mar; 30(3):510-1*
13. Grob JJ, Bonerandi JJ. The 'ugly duckling' sign: identification of the common characteristics of nevi in an individual as a basis for melanoma screening. *Arch Dermatol 1998; 134(1):103-4*
14. Scope A, Dusza SW, Halpern AC, Rabinovitz H, Braun RP, Zalaudek I, Argenziano G, Marghoob AA. The "ugly duckling" sign: agreement between observers. *Arch Dermatol 2008 Jan; 144(1):58-64*
15. McPherson M, Elwood M, English DR, Baade PD, Youl PH, Aitken JF. Presentation and detection of invasive melanoma in a high-risk population. *J Am Acad Dermatol 2006; 54(5):783-92*
16. Williams HA, Fritschi L, Reid A, Beauchamp C, Katris P. Who attends skin cancer screening in Western Australia? Results from the Lions Cancer Institute Skin Cancer Screening Program. *Aust N Z J Public Health 2006; 30(1):75-80*

17. Carli P, De Giorgi V, Palli D, Maurichi A, Mulas P, Orlandi C, Imberti G, Stanganelli I, Soma P, Dioguardi D, Catricala C, Betti R, Paoli S, Bottoni U, Lo Scocco G, Scalvenzi M, Giannotti B. Self-detected cutaneous melanomas in Italian patients. *Clin Exp Dermatol 2004 Nov; 29(6):593-6*
18. Carli P, De Giorgi V, Giannotti B, Seidenari S, Pellacani G, Peris K, Piccolo D, Rubegni P, Andreassi L. Skin cancer day in Italy: method of referral to open access clinics and tumor prevalence in the examined population. *Eur J Dermatol 2003 Jan-Feb; 13(1):76-9*
19. Stanganelli I, Clemente C, Mihm MC jr. Melanoma Cutaneo. Atlante interattivo per la prevenzione, diagnosi e terapia del melanoma e delle lesioni pigmentate (CD Rom). *@Stanganelli/IOR, MAF, Torino, 2001*
20. Kelly JW, Chamberlain AJ, Staples MP, McAvoy B. Nodular melanoma. No longer as simple as ABC. *Aust Fam Physician 2003; 32(9):706-9*
21. Marsden JR, Newton-Bishop JA, Burrows L, Cook M, Corrie PG, Cox NH, Gore ME, Lorigan P, MacKie R, Nathan P, Peach H, Powell B, Walker C; British Association of Dermatologists Clinical Standards Unit. Revised U.K. guidelines for the management of cutaneous melanoma 2010. *Br J Dermatol 2010 Aug; 163(2):238-56*
22. Australian Cancer Network Melanoma Guidelines Revision Working Party. Clinical Practice Guidelines for the Management of Melanoma in Australia and New Zealand. The Cancer Council Australia and Australian Cancer Network, Sydney and New Zealand Guidelines Group, *Wellington (2008)*. Downloaded from the Australian Cancer Network website at www.cancer.org.au
23. Carli P, Nardini P, Crocetti E, De Giorgi V, Giannotti B. Frequency and characteristics of melanomas missed at a pigmented lesion clinic: a registry-based study. *Melanoma Res 2004 Oct; 14(5):403-7*
24. AIRTUM Working group. I tumori in Italia-Rapporto 2009. I trend di incidenza e mortalità dell'Associazione italiana registri tumori (AIRTUM) 1998-2005. *Epidemiol Prev 2009; 33(1):19-26*
25. Vestergaard ME, Macaskill P, Holt PE, Menzies SW. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. *Br J Dermatol 2008 Sep; 159(3):669-76*
26. Carli P, De Giorgi V, Crocetti E, Mannone F, Massi D, Chiarugi A, Giannotti B. Improvement of malignant/benign ratio in excised melanocytic lesions in the 'dermoscopy era': a retrospective study 1997-2001. *Br J Dermatol 2004 Apr; 150(4):687-92*
27. Carli P, De Giorgi V, Chiarugi A, Nardini P, Weinstock MA, Crocetti E, Stante M, Giannotti B. Addition of dermoscopy to conventional naked-eye examination in melanoma screening: a randomized study. *J Am Acad Dermatol 2004 May; 50(5):683-9*

28. Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S, Talamini R, Corona R, Sera F, Binder M, Cerroni L, De Rosa G, Ferrara G, Hofmann-Wellenhof R, Landthaler M, Menzies SW, Pehamberger H, Piccolo D, Rabinovitz HS, Schiffner R, Staibano S, Stolz W, Bartenjev I, Blum A, Braun R, Cabo H, Carli P, De Giorgi V, Fleming MG, Grichnik JM, Grin CM, Halpern AC, Johr R, Katz B, Kenet RO, Kittler H, Kreusch J, Malvehy J, Mazzocchetti G, Oliviero M, Ozdemir F, Peris K, Perotti R, Perusquia A, Pizzichetta MA, Puig S, Rao B, Rubegni P, Saida T, Scalvenzi M, Seidenari S, Stanganelli I, Tanaka M, Westerhoff K, Wolf IH, Braun-Falco O, Kerl H, Nishikawa T, Wolff K, Kopf AW. Dermoscopy of pigmented skin lesions: results of a consensus meeting via the Internet. *J Am Acad Dermatol 2003 May; 48(5):679-93*
29. Pizzichetta MA, Stanganelli I, Bono R, Soyer HP, Magi S, Canzonieri V, Lanzanova G, Annessi G, Massone C, Cerroni L, Talamini R; Italian Melanoma Intergroup (IMI). Dermoscopic features of difficult melanoma. *Dermatol Surg 2007 Jan; 33(1):91-9*
30. Baade P, Coory M. Trends in melanoma mortality in Australia: 1950-2002 and their implications for melanoma control. *Aust NZ J Public Health 2005; 29(4):383-6*
31. Aitken JF, Elwood JM, Lowe JB, Firman DW, Balanda KP, Ring IT. A randomised trial of population screening for melanoma. *J Med Screen 2002; 9(1):33-7*
32. Aitken JF, Youl PH, Janda M, Lowe JB, Ring IT, Elwood M. Increase in skin cancer screening during a community-based randomized intervention trial. *Int J Cancer 2006; 118(4):1010-6*
33. Geller AC, Sober AJ, Zhang Z, Brooks DR, Miller DR, Halpern A, Gilchrest BA. Strategies for improving melanoma education and screening for men age >or= 50 years: findings from the American Academy of Dermatological National Skin Cancer Sreening Program. *Cancer 2002 Oct 1; 95(7):1554-61*
34. Melia J, Cooper EJ, Frost T, Graham-Brown R, Hunter J, Marsden A, Du Vivier A, White J, Whitehead S, Warin AP, et al. Cancer Research Campaign health education programme to promote the early detection of cutaneous malignant melanoma. II. Characteristics and incidence of melanoma. *Br J Dermatol 1995 Mar; 132(3):414-21*
35. Melia J, Moss S, Coleman D, Frost T, Graham-Brown R, Hunter JA, Marsden RA, du Vivier A, Warin AP, White J, Whitehead SM, Wroughton MA. The relation between mortality from malignant melanoma and early detection in the Cancer Research Campaign Mole Watcher Study. *Br J Cancer 2001 Sep 14; 85(6):803-7*
36. Vandaele MM, Richert B, Van der Endt JD, Boyden B, Brochez L, del Marmol V, De Boulle K, Garmyn M, Laporte M, Maselis I, Pirard C, Roseeuw D, Schramme M, Tromme I. Melanoma screening:

results of the first one-day campaign in Belgium ('melanoma Monday'). *J Eur Acad Dermatol Venereol 2000 Nov; 14(6):470-2*

37. Cristofolini M, Bianchi R, Boi S, De Carli A, Micciolo R, Cristofolini P, Zumiani G. Effectiveness of the health campaign for the early diagnosis of cutaneous melanoma in Trentino, Italy. *J Dermatol Surg Oncol 1993 Feb; 19(2):117-20*
38. Garattini L, Cainelli T, Tribbia G, Scopelliti D. Economic evaluation of an educational campaign for early diagnosis of cutaneous melanoma. *Pharmacoeconomics 1996 Feb; 9(2):146-55*
39. Boi S, Cristofolini M, Micciolo R, Polla E, Piffer S, Gentilini M. Incidence and mortality data from cutaneous melanoma in Trentino: registry-based study. *J Cutan Med Surg 2008 Mar-Apr; 12(2):59-63*
40. Rossi CR, Vecchiato A, Bezze G, Mastrangelo G, Montesco MC, Mocellin S, Meneghetti G, Mazzoleni F, Peserico A, Nitti D, Lise M. Early detection of melanoma: an educational campaign in Padova, Italy. *Melanoma Res 2000; 10(2):181-7*
41. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer 2005 Jan; 41(1):28-44*
42. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer 2005 Jan; 41(1):45-60*
43. Palmieri G, Casula M, Sini MC, Ascierto PA, Cossu A. Issues affecting molecular staging in the management of patients with melanoma. *J Cell Mol Med 2007 Sep-Oct; 11(5):1052-68*

7.0 DIAGNOSI ISTOPATOLOGICA E MOLECOLARE

7.1 Classificazione clinico-patologica di Clark
7.2 Caratteristiche clinico-patologiche
7.3 Classificazione molecolare
7.4 Confronto tra istotipi tradizionali e classificazione molecolare
7.5 Classificazione molecolare e trattamento del melanoma metastatico

La tradizionale classificazione clinico-patologica del melanoma, basata sull'aspetto clinico macroscopico e sulle caratteristiche istopatologiche, comprende 4 principali istotipi:

i) melanoma a diffusione superficiale;
ii) melanoma nodulare;
iii) melanoma su *lentigo maligna*;
iv) melanoma acrale-lentigginoso.

Tale classificazione si è diffusa a seguito del pioneristico contributo di Clark, McGovern, Mihm, Reed ed altri alla fine degli anni '60 e gli anni '70 (1,2). Da allora, sono stati però identificati altri istotipi, meno frequenti, ma pur sempre ben caratterizzati, tra i quali il melanoma desmoplastico ed il melanoma nevoide.
Le varie forme sono riportate nella classificazione istopatologica del melanoma attualmente utilizzata e riportata nel volume "*Pathology and Genetics of Skin Tumours*" del *World Health Organization* (WHO) (3) (Tabella 1).

Tabella 1 Classificazione istologica del melanoma cutaneo (WHO 2006)

Istotipo	***Codice Morfologico****
Melanoma a diffusione superficiale	8743/3
Melanoma nodulare	8721/3
Lentigo maligna	8742/2
Melanoma acrale-lentigginoso	8744/3

segue

Melanoma desmoplastico	8745/3
Melanoma insorto su nevo blu	8780/3
Melanoma insorto su nevo congenito gigante	8761/3
Melanoma dell'infanzia	
Melanoma nevoide	8720/3
Melanoma persistente e metastatico	8720/3

***** Codice morfologico dell'*International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O)* e della *Systematized Nomenclature of Medicine* (http://snomed.org).
Il comportamento clinico è codificato: /3 per tumori maligni e /2 per tumori non-invasivi.

Originariamente, è stata avanzata l'idea che ciascun principale istotipo del melanoma fosse associato ad un peculiare comportamento clinico e ad una diversa prognosi (1,2). Tuttavia, questa ipotesi iniziale non è stata confermata negli studi successivi, tra cui la recente valutazione di un'ampia casistica effettuata dall'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC) *Melanoma Taskforce* (4-6).
Attualmente, la prognosi di un paziente con melanoma primitivo con malattia clinicamente localizzata dipende principalmente dallo spessore del tumore, sebbene altri parametri, tra i quali l'attività mitotica, la presenza di ulcerazione, la sede anatomica e, in minor misura, caratteristiche cliniche del paziente quali l'età ed il sesso, abbiano mostrato un significato prognostico indipendente.
Al contrario, i principali istotipi del melanoma non hanno un significato prognostico indipendente. Inoltre, le attuali raccomandazioni per la gestione clinica dei pazienti affetti da melanoma primitivo localizzato, compresa l'ampiezza dei margini di escissione e l'appropriatezza della biopsia del linfonodo sentinella, sono basate principalmente sullo spessore della neoplasia ed altri parametri (7,8), mentre l'istotipo in base alla classificazione WHO non è un parametro che influenza il trattamento, né per melanoma primitivo né per quello metastatico.
Per queste motivazioni, alcuni autorevoli studiosi hanno sostanzialmente ritenuto opportuno l'abbandono definitivo della tradizionale classificazione istopatologica del melanoma.
Negli ultimi 10 anni, sono state identificate una serie di alterazioni molecolari associate al melanoma. In particolare, sono state documentate specifiche mutazioni nelle chinasi della via di trasduzione

del segnale di MAP (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), in circa il 70% dei melanomi e, più recentemente, sono state valutate le correlazioni tra tali mutazioni e parametri clinici e patologici (9,10) ed il valore delle alterazioni molecolari a potenziale oncogenico come possibili nuovi e selettivi bersagli terapeutici (11-14) (vedi sottocap. 11.4). Queste recenti acquisizioni hanno stimolato l'interesse ad una classificazione molecolare del melanoma al fine di identificare sottogruppi di pazienti, che condividendo meccanismi patogenetici molecolari simili od identici, si comportano clinicamente in maniera simile e potenzialmente possono beneficiare di comuni strategie terapeutiche. Di grande interesse, è il confronto (in continua evoluzione in base al rinnovarsi delle conoscenze) tra la tradizionale classificazione clinico-patologica e la classificazione molecolare basata sulle mutazioni somatiche (vedi cap. 2.0). Ad esempio, i melanomi associati a prominente danno solare (melanoma su *lentigo maligna*) in genere mostrano mutazioni di *N-RAS* e talora di *c-KIT*, mentre i melanomi a diffusione superficiale che insorgono nella cute di aree sottoposte ad esposizione solare intermittente, spesso mostrano mutazioni di *BRAF* (9,10,15-17). Vi è attualmente un notevole consenso sull'opportunità di procedere ad una sempre più dettagliata caratterizzazione molecolare del melanoma. L'obiettivo finale è quello di identificare e selezionare in maniera opportuna i pazienti che possono beneficiare di terapie molecolari mirate.

7.1 Classificazione clinico-patologica di Clark

Nel 1967, Clark pubblicò la classificazione istogenetica del melanoma che ancora oggi costituisce la base per la classificazione WHO attualmente utilizzata (1). Clark descrisse 3 istotipi di melanoma (melanoma su *lentigo*, melanoma a diffusione superficiale e melanoma nodulare), distinti principalmente sulla base delle caratteristiche della componente intra-epidermica alla periferia (piuttosto che al di sopra) della componente dermica invasiva. Le caratteristiche istopatologiche in base alle quali si distinguono gli istotipi erano di tipo architetturale e relative alla componente *in situ*, intra-epidermica (compresa l'entità di crescita pagetoide e lentigginosa) ed anche alcune modificazioni della componente non-neoplastica, quali modificazioni epidermiche ed associata elastosi solare dermica. Inoltre, caratteristiche cliniche, quali la sede anatomica e l'età

del paziente, contribuivano alla definizione dell'istotipo e pertanto la classificazione di Clark è generalmente considerata una classificazione clinico-patologica.
Nella sua descrizione originale, Clark ipotizzò che i diversi istotipi fossero associati ad una diversa prognosi, un suggerimento supportato nel 1969 e successivamente confermato da McGovern (1,2). Nella pubblicazione del 1969, Clark et al. mostrarono inoltre che la prognosi del melanoma risultava essere associata alla profondità di invasione, categorizzata in base ai livelli di cute coinvolta (oggi noti come livelli di Clark) (1,2). Sebbene fosse stato documentato, in precedenza, che la profondità di invasione fosse associata alla prognosi nel melanoma, questo fu precedente alla nota pubblicazione di Breslow nel 1970 sul significato prognostico dello spessore (18). Nel 1970, McGovern pubblicò la sua classificazione, simile a quella proposta da Clark, sebbene utilizzando una diversa terminologia: melanoma insorto su *Hutchinson's melanotic freckle* (nella terminologia di Clark: "associato a *lentigo maligna*"), melanoma insorto su melanosi pre-maligna (Clark: "melanoma a diffusione superficiale") e melanoma nodulare (Clark: "melanoma nodulare") (2).
Da allora, sono stati descritti un numero crescente di ulteriori istotipi, definiti sulla base di criteri clinici e patologici, tra i quali il melanoma desmoplastico, il melanoma nevoide e melanomi insorti in associazione con il nevo blu. Nell'attuale ed ultima versione della classificazione WHO dei Tumori della Cute (2006), i 4 istotipi principali sono elencati accanto a 6 altri istotipi meno frequenti (Tabella 1) (3).

7.2 Caratteristiche clinico-patologiche

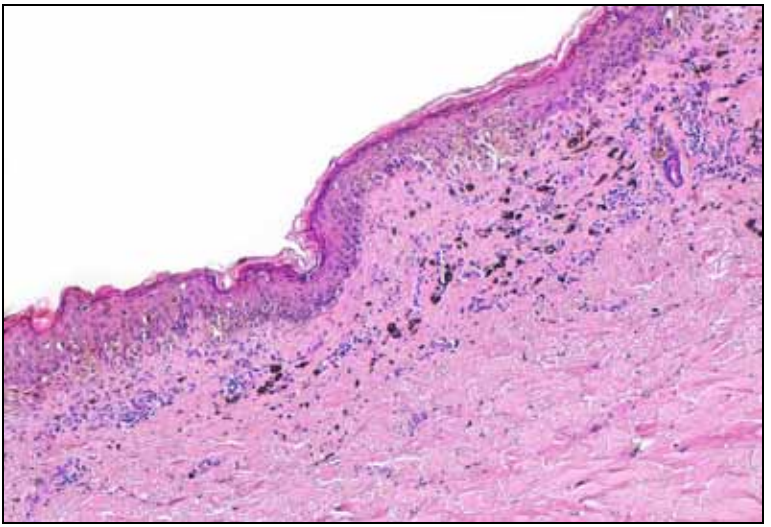
Nel 1984, Clark et al. hanno identificato fasi differenti nello sviluppo del melanoma, in cui da un'iniziale proliferazione prevalentemente piatta, che si estende lungo il raggio di una circonferenza irregolare (fase orizzontale), si procede ad una fase di crescita verticale, perpendicolare alla precedente, con estensione in profondità (19). La prima fase di crescita orizzontale è caratterizzata, istologicamente, da una proliferazione intra-epiteliale di melanociti atipici (melanoma *in situ*) o da un'iniziale infiltrazione del derma papillare. In tale fase, il melanoma anche se invasivo mostra una buona prognosi.

La fase di crescita verticale è caratterizzata da una proliferazione espansiva dermica, che non è una semplice estensione della neoplasia in profondità, ma è la comparsa di un nuovo aspetto morfologico e di nuove caratteristiche biologiche nel melanoma, il quale acquista nuove capacità tumorigeniche con possibilità di diffusione a distanza. In particolare, i due criteri principali per il riconoscimento della fase di crescita verticale nei melanomi "sottili" sono (20,21): i) presenza di uno o più aggregati di cellule di melanoma nel derma che abbiano dimensioni maggiori del più grande aggregato intra-epidermico; ii) presenza di figure mitotiche nel derma papillare.
Ulteriori criteri secondari includono: i) compressione od infiltrazione dei tessuti circostanti da parte del nodulo "espansivo"; ii) cellule neoplastiche meno pigmentate e più grandi (atipiche) di quelle osservate nella fase di crescita orizzontale; iii) infiltrato linfoistioide reattivo meno cospicuo rispetto a quello osservato nella fase di crescita orizzontale; iv) la fase di crescita verticale è spesso osservata in corrispondenza delle aree di parziale regressione della fase di crescita orizzontale.
Da un punto di vista istopatologico, gli istotipi più frequenti di melanoma sono distinti principalmente sulla base di caratteristiche morfologiche della componente intra-epidermica del tumore adiacente alla componente dermica invasiva. Quando la componente dermica è presente, essa non mostra caratteristiche specifiche nei diversi istotipi principali di melanoma.

Melanoma a diffusione superficiale
Il melanoma a diffusione superficiale (SSM) generalmente insorge in pazienti di età più giovane (età mediana 50 anni) rispetto a pazienti affetti da melanoma nodulare (NM) o melanoma su *lentigo maligna* (LMM). Tipicamente, coinvolge sedi anatomiche sottoposte ad esposizione solare intermittente, quali il tronco, il dorso e le estremità. Il SSM generalmente si presenta come una lesione piana dal profilo irregolare, pigmentazione variegata ed a lenta crescita. La lesione si accresce in modo radiale fino a che non si sviluppa invasione dermica; quest'ultima generalmente si associa clinicamente con la presenza di un'area rilevata sul piano cutaneo. Istologicamente, la componente intra-epidermica di un SSM si caratterizza per la presenza di melanociti epitelioidi e pleomorfi disposti in teche od in singole unità, con risalita intra-epidermica pagetoide (Figura 1). Talora, la componente intra-epidermica mostra un *pattern* di crescita a tipo nevo displastico.

Il SSM invasivo è una proliferazione melanocitaria asimmetrica, caratterizzata da una distribuzione irregolare di melanociti disposti sia in teche sia in singole unità a livello intra-epidermico ed una componente dermica nella quale non si osserva una chiara maturazione (diminuzione nella dimensione delle teche, delle cellule, dei nuclei e dei nucleoli nella porzione più profonda della lesione rispetto alla componente più superficiale). Nel contesto della lesione vi è generalmente una distribuzione irregolare del pigmento. Sono presenti figure mitotiche, talora atipiche.

Figura 1



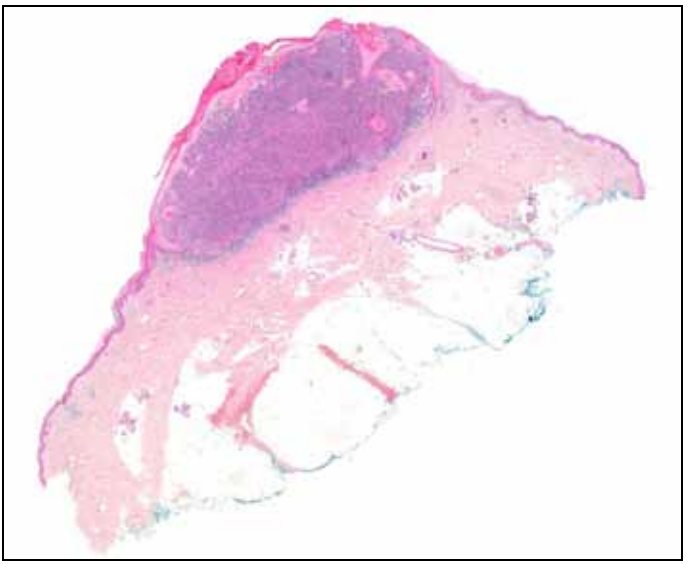
Melanoma a diffusione superficiale: la componente intra-epidermica si caratterizza per la presenza di melanociti atipici disposti in teche o in singole unità, con risalita intra-epidermica pagetoide.

Melanoma nodulare (NM)

I NM insorgono in età più avanzata rispetto ai SSM (età mediana 70 anni). Essi possono insorgere in qualsiasi sede e generalmente si presentano con un nodulo a rapida crescita dal profilo polipoide/ esofitico. L'epidermide sovrastante può essere atrofica e/o ulcerata. Clinicamente, possono essere confusi con altre neoplasie cutanee, quali carcinoma a cellule basali, specialmente se amelanotici.

Istologicamente, per definizione, le cellule di melanoma possono essere presenti nell'epidermide sovrastante, ma non si estendono 3 creste epidermiche oltre i margini laterali della componente nodulare. La componente dermica è caratterizzata da teche e/o aggregati confluenti, generalmente senza fenomeni di maturazione (Figura 2). Si possono osservare melanociti a morfologia epitelioide, fusata, nevoide o pleomorfa in variabile combinazione, le cellule mostrano espressioni di ipercromasia, pleomorfismo e nucleoli prominenti.

Figura 2



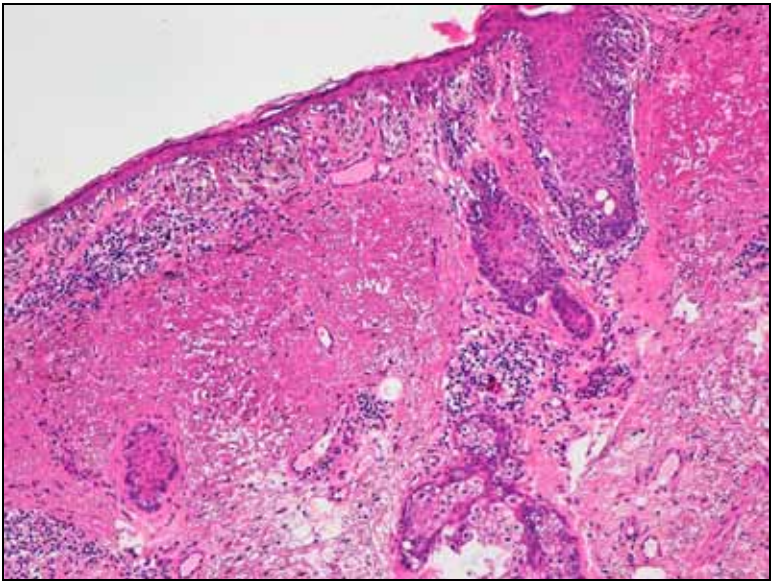
Melanoma nodulare: la componente dermica è caratterizzata da teche ed aggregati confluenti di melanociti epitelioidi e pleomorfi e, per definizione, non si estende lateralmente oltre 3 creste epidermiche.

Melanoma su lentigo maligna

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

mostri invasione nel derma. Istologicamente, LMM è caratterizzato da una proliferazione lentigginosa di melanociti atipici su cute severamente foto-danneggiata (Figura 3). L'epidermide mostra atrofia con perdita del profilo della rete *ridges*, danno attinico severo (elastosi solare) ed assottigliamento dermico. Spesso, si documenta l'estensione della proliferazione melanocitaria nel contesto delle porzioni più superficiali dell'epitelio dei follicoli piliferi e dei dotti sudoripari e la presenza di occasionali melanociti giganti multinucleati.
Il termine *lentigo maligna* si riferisce al melanoma con crescita esclusivamente intra-epidermica (melanoma *in situ*). Quando la neoplasia si estende nel derma, si utilizza il termine di melanoma su *lentigo maligna*. La componente invasiva è costituita da melanociti atipici di forma fusata e, più raramente, epitelioide o nevoide, disposti in aggregati e teche anisodimensionali, spesso commiste ad uno scarso infiltrato infiammatorio con melanofagi.

Figura 3

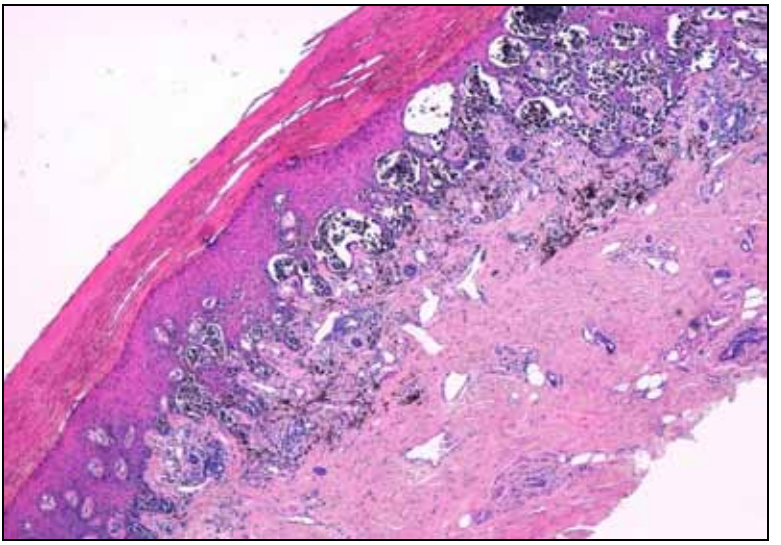


Lentigo maligna: proliferazione lentigginosa di melanociti atipici su cute severamente foto-danneggiata, con estensione nell'epitelio dei follicoli piliferi. L'epidermide mostra atrofia con perdita del profilo della rete *ridges*.

Melanoma acrale-lentigginoso

Il melanoma acrale-lentigginoso (ALM) coinvolge le sedi acrali (regione palmare, plantare e subungueale). Generalmente, si presenta come una chiazza pigmentata a lenta crescita. Il melanoma acrale lentigginoso ha un aspetto isto-patologico peculiare: in fase di crescita orizzontale, la lesione è caratterizzata da una marcata acantosi, strato corneo ispessito, allungamento della rete *ridges* e da una proliferazione lentigginosa di melanociti atipici a livello giunzionale, con migrazione delle cellule neoplastiche fino agli strati più superficiali dell'epidermide (Figura 4). Spesso, si associa un infiltrato linfocitario a livello della giunzione dermo-epidermica. La componente *in situ* di un ALM è costituita da melanociti atipici con nuclei ingranditi e nucleoli prominenti e citoplasma repleto di melanina. I melanociti mostrano prominenti e lunghi processi dendritici. I melanociti atipici spesso coinvolgono i dotti sudoripari, estendendosi nel derma reticolare profondo. In fase di crescita verticale, gli aggregati neoplastici sono costituiti da melanociti di forma fusata sullo sfondo di una spiccata desmoplasia.

Figura 4



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

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

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

Melanoma nevoide
Il melanoma nevoide rappresenta l'1-2% dei melanomi ed è un istotipo che simula da un punto di vista architetturale e citologico un nevo comune acquisito. Le lesioni mostrano un profilo cupoliforme, polipoide o verrucoso. Generalmente, si tratta di melanomi che hanno una minima od assente crescita intra-epidermica pagetoide, un profilo relativamente simmetrico ed appaiono ben circoscritti lateralmente. La componente dermica è caratterizzata da aggregati o teche confluenti di melanociti di piccole dimensioni, piuttosto monomorfi, con nuclei ipercromatici, con spiccata attività mitotica nelle lesioni di cospicue dimensioni. Spesso si tratta di melanomi che insorgono su nevo.

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

La tradizionale classificazione clinico-patologica del melanoma, basata sull'originale proposta di Clark e di altri studiosi, compresa l'attuale classificazione WHO, sono state ampiamente criticate. Innanzitutto, lo schema nosologico tradizionale non si basa esclusivamente su criteri morfologici cito-architetturali.
Infatti, nell'inquadramento dell'istotipo si deve anche prendere in considerazione la sede della lesione (particolarmente per le neoplasie acrali e, in parte, anche per melanoma insorti su sedi foto-esposte). Un'ulteriore debolezza della classificazione è data dalla scarsa specificità dei reperti morfologici, per cui i diversi istotipi mostrano talora aspetti morfologici sovrapponibili. Per esempio, la risalita pagetoide è caratteristica dello SSM, ma si osserva anche nelle fasi avanzate del melanoma su LM e nell'ALM.
La crescita in *pattern* lentigginoso è simile nel LM, nell'ALM e nel melanoma delle mucosa, pertanto gli istotipi si possono correttamente distinguere sulla base della sede anatomica e delle modificazioni delle relative strutture anatomiche. Un ulteriore limite della classificazione tradizionale è data dal fatto che alcune caratteristiche diagnostiche sono relative alla componente non neoplastica, piuttosto che tumorale. Per esempio, modificazioni epidermiche, quali atrofie con perdita della rete *ridges*, è caratteristico della LM, mentre l'ispessimento dell'epidermide si osserva generalmente nello SSM e nell'ALM e si osserva costantemente nel melanoma spitzoide.
Inoltre, alterazioni dermiche sono altrettanto rilevanti, soprattutto la presenza di elastosi solare nella LM. Infine, un'ulteriore critica è rappresentata dal fatto che è possibile osservare più di un istotipo in uno stesso tumore: il melanoma desmoplastico è spesso accompagnato da una componente intra-epidermica tipo LM, il melanoma nevoide generalmente ha criteri per essere definito NM e, in alcuni casi, mostra aspetti da melanoma spitzoide o da SSM. In generale, la classificazione per istotipi è scarsamente riproducibile tra patologi.
E' stato recentemente sottolineato che la tradizionale classificazione morfologica del melanoma ha scarso impatto da un punto di vista clinico e terapeutico, particolarmente in merito alla mancata correlazione tra istotipi e prognosi. Infatti, numerosi studi della letteratura hanno dimostrato che l'istotipo non costituisce un fattore prognostico indipendente, in pazienti affetti da melanoma primitivo con malattia localizzata (7,8). Tuttavia, esistono delle eccezioni; è noto infatti che il melanoma desmoplastico, particolarmente in forma pura, ha un

comportamento biologico più assimilabile a quello di un sarcoma che di un melanoma, con più frequente disseminazione per via ematogena, con coinvolgimento polmonare, anziché metastasi linfonodali (22). Di conseguenza, a causa della bassa frequenza di positività del linfonodo sentinella, in molti Centri non viene effettuata la biopsia del linfonodo sentinella se la diagnosi istologica è quella di melanoma desmoplastico (23). Inoltre, a causa della tendenza a sviluppare recidiva locale ed alla frequente difficoltà nell'ottenere margini di escissione adeguati, spesso, dopo l'asportazione del tumore, i pazienti affetti da melanoma desmoplastico sono sottoposti a radioterapia post-operatoria (24). Infine, è noto che la componente intra-epidermica periferica di LM, ALM e melanoma mucoso è spesso discontinua e poco circoscritta, con una graduale riduzione del numero di melanociti e diminuzione del loro grado di atipia alla periferia della lesione, con modificazioni che tendono a ridursi verso la cute non affetta (25). Pertanto, in presenza di questi istotipi tumorali può essere difficile stabilire con certezza i margini di escissione chirurgica. Questa informazione (istotipo), insieme ai dati clinici, deve quindi sempre essere considerata con attenzione nella gestione del paziente, specialmente se la neoplasia interessa sedi anatomiche critiche da un punto di vista estetico e funzionale.

7.3 Classificazione molecolare

Agli inizi del XXI secolo abbiamo assistito ad uno straordinario sviluppo delle applicazioni cliniche delle tecnologie di biologia molecolare che ha enormemente facilitato la comprensione dei meccanismi patogenetici e molecolari di numerose neoplasie maligne, compreso il melanoma (26). Nel 2005, Curtin et al. pubblicarono il lavoro fondamentale, che mostrava la presenza di un'elevata frequenza di mutazioni somatiche oncogene e di amplificazioni in melanomi umani e la loro associazione con la sede anatomica del tumore primitivo e con il grado di foto danneggiamento (9). L'attivazione aberrante della via di segnale di MAPK è stata documentata in oltre l'80% dei melanomi primitivi (9,14,16,27-30) e specifiche mutazioni di proteine lungo la via RAS-RAF-MEK-ERK oggi sono ritenute mutualmente esclusive (16,28,29). Tali mutazioni sono state documentate in tutti gli istotipi di melanoma, compreso il melanoma cutaneo (50% *BRAF*, 15% *NRAS*, fino al 17% *cKIT* in cute cronicamente foto-danneggiata),

melanomi mucosi (11% *BRAF*, 5% *NRAS*, 21% *cKIT*) ed uveali (50% *GNAQ*) (Tabella 2). Queste mutazioni risultano in effetti complessi biologici pro-oncogenici. L'oncogene *NRAS* tra le varie proprietà, attiva anche la cascata di PI3K. La via di segnale di MAPK può condurre ad una proliferazione in cellule trasformate, ma si ritiene che sia anche in grado di indurre un forte arresto della crescita, noto come senescenza, in melanociti normali (31). Nel 2002, per la prima volta sono state identificate mutazioni somatiche *missense* di *BRAF* in un numero elevato di neoplasie, che in genere portano ad un'attivazione costitutiva di *BRAF* (27). Attualmente, sono state identificate più di 75 mutazioni nel gene *BRAF*, le più frequenti sono a livello dell'esone 15. Il 75% di queste rappresentano mutazioni puntiformi del DNA, che causano una singola sostituzione aminoacidica (Valina 600 in Acido Glutamico, V600E) nel prodotto proteico, un ulteriore 20% determina la sostituzione da Valina 600 in Lisina (V600K) ed infine il 6% è rappresentato da altri genotipi. I melanomi che mostrano mutazioni di *BRAF* si manifestano in età più giovanile (tali mutazioni si osservano nell'86% dei pazienti di età compresa tra 20 e 30 anni), a livello del tronco od agli arti ed associati ad un basso danno solare cumulativo (Tabella 2). Mentre lo stato mutazionale di *BRAF* non sembra avere significato prognostico al momento della diagnosi del tumore primitivo, evidenze recenti indicano che la mutazione di *BRAF* si associa ad una prognosi più sfavorevole nei pazienti con melanoma metastatico.

Tabella 2 Principali mutazioni somatiche nel melanoma avanzato

Mutazione	***Percentuale di melanomi con mutazione***	***Associazioni fenotipiche***
BRAF	50%	Età giovanile Esposizione solare intermittente Tronco, estremità Elevato numero di nevi melanocitici Poche lentiggini Facilità ad abbronzarsi Istotipo melanoma a diffusione superficiale

segue

NRAS	15-20%	Esposizione solare intermittente (debole associazione) Assente o scarsa diffusione pagetoide Circoscrizione periferica
cKIT	2% (10-20% dei melanomi acrali e melanomi mucosali)	Sedi acrale e mucosale Istotipo melanoma acrale-lentigginoso e melanomi mucosali
GNAQ/GNA11	40-50% dei melanomi uveali; melanomi tipo nevi blu?	Melanoma uveale

7.4 Confronto tra istotipi tradizionali e classificazione molecolare

Lo studio delle possibili correlazioni tra stato mutazionale e caratteristiche morfologiche cito-architetturali del melanoma mostra che i melanomi *BRAF* mutati insorgono tipicamente in sedi anatomiche sottoposte ad esposizione solare intermittente e che istologicamente mostrano caratteristiche di SSM. Inoltre, la mutazione di *BRAF* è risultata associata alle seguenti caratteristiche morfologiche: significativa risalita intra-epidermica pagetoide, tendenza dei melanociti a disporsi in teche, intensa pigmentazione, melanociti epitelioidi di grandi dimensioni, circoscrizione, ispessimento epidermico e minima elastosi solare (15,17). I melanomi che insorgono su cute cronicamente foto-esposta (regione testa/collo, volto, superficie dorsale e distale delle estremità) ed associati istologicamente a marcata elastosi solare hanno una minore prevalenza di mutazioni di *BRAF*, mentre circa il 30-40% di essi mostra mutazioni di *c-KIT* o *NRAS*. Mutazioni di *c-KIT*, inoltre, si osservano in melanomi del tipo ALM e melanomi mucosali lentigginosi (9,16). Inoltre, le amplificazioni osservate nei melanomi in sede acrale coinvolgono generalmente il cromosoma 11q13 (dove si trova il locus della ciclina D1) e hTERT a livello del cromosoma 5p. Al contrario, la ciclina D1 è raramente amplificata nei melanomi delle mucose, dove le amplificazioni coinvolgono i loci CDK4 e MDM2 su 12q (9). Al presente, i melanomi nodulari non sembrano mostrare alterazioni molecolari peculiari. Questo suggerisce

che il melanoma nodulare verosimilmente non rappresenti un istotipo assimilabile agli altri (15).

7.5 Classificazione molecolare e trattamento del melanoma metastatico

Le mutazioni oncogene osservate nel melanoma rappresentano oggi importanti bersagli di terapie molecolari mirate. Le 4 mutazioni note (*BRAF*, *GNAQ*, *c-KIT*, *NRAS*) della via di segnale di MAPK sono generalmente mutualmente esclusive. Con il progredire delle conoscenze, è probabile che nell'arco di pochi anni verranno identificate nuove e diverse mutazioni che potranno costituire ulteriori bersagli per terapie innovative, tra le quali la mutazione di *ERBB4* (*tyrosine receptor kinase*), che è stata riportata in circa il 19% dei melanomi. Inoltre, un ulteriore approfondimento del fenotipo clinico-patologico che corrisponda a tali mutazioni potrebbe rappresentare una cornice all'interno della quale selezionare opportunamente i pazienti candidati alle nuove terapie.
Al presente, la proteina B-RAF sembra rappresentare un bersaglio particolarmente attraente in termini terapeutici poiché la mutazione: a) ha un'elevata prevalenza nel melanoma; b) coinvolge una *serine/threonine kinase* con un *kinase domain* identificabile come relativamente facile bersaglio per farmaci ad azione inibitoria; c) non è presente in cellule normali. L'inibizione della proteina BRAF mutata nel melanoma rappresenta una strategia terapeutica di grande potenzialità già evidenziata in studi clinici condotti in pazienti affetti da melanoma metastatico (12,13). Risultati recenti di uno studio di fase III con Vemurafenib (PLX-4032) hanno mostrato una risposta clinica del 48.4%, in pazienti con melanoma $BRAF^{V600E}$ mutato ed un intervallo libero da progressione pari a 5,3 mesi, con un significativo vantaggio rispetto ai pazienti trattati con chemioterapia *standard*, Dacarbazina (DTIC) (32). Questo trattamento è stato ben tollerato, sebbene il 18% dei pazienti trattati abbia sviluppato carcinomi a cellule squamose e cheratoacantomi, verosimilmente dovuti all'attivazione oncogena della via di segnale di MAPK nei cheratinociti. Pertanto, nel prossimo futuro la strategia terapeutica più promettente potrebbe essere quella dell'utilizzo di una combinazione di inibitori di BRAF ed inibitori di MEK.
I pazienti affetti da melanoma metastatico con mutazioni di *c-KIT* sono stati invece trattati con inibitori di c-KIT, con evidenze

di una parziale risposta clinica (28). Nonostante queste incoraggianti risposte iniziali con inibitori di BRAF, in termini di intervallo libero da malattia, evidenziate negli studi clinici, va ricordato che la maggior parte dei pazienti ha sviluppato resistenza acquisita alla terapia. Inoltre, il 20-40% dei pazienti non risponde già in fase iniziale, (resistenza primaria) e remissioni complete sono estremamente rare.
Pertanto, in analogia con altre neoplasie, la resistenza acquisita agli inibitori chinasici sembra anche nel melanoma limitare fortemente la durata dell'efficacia terapeutica. E' verosimile che la scoperta dei meccanismi responsabili dell'instaurarsi della resistenza porterà nel prossimo futuro a nuovi approcci di combinazione più duraturi nella loro efficacia.
In conclusione, nel corso dell'ultimo decennio, abbiamo assistito ad enormi progressi nella comprensione dei meccanismi molecolari alla base dello sviluppo e della progressione del melanoma e parte di questi risultati sono già stati integrati nella classificazione e nella terapia di pazienti affetti da melanoma metastatico. Oltre alle informazioni relative alle mutazioni somatiche, la letteratura più recente ha riportato nuovi dati sull'espressione di RNA, microRNA e proteomica (33). Tuttavia, è ancora da definire sia il ruolo patogenetico sia la rilevanza clinica di queste ulteriori informazioni e quale sia il modo migliore per utilizzarle in merito alla classificazione del melanoma ed al trattamento personalizzato dei pazienti.
Non vi è dubbio che la comprensione di risultati della ricerca genetica e farmacologico-molecolare porterà a definire meglio la classificazione del melanoma, che dovrà integrare dati clinici, patologici e bio-molecolari, al fine ultimo di raggiungere una più precisa caratterizzazione dei tipi biologicamente distinti, che soprattutto possano indirizzare ad una terapia efficacemente personalizzata dei pazienti.

BIBLIOGRAFIA

1. Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res 1969; 29:705-27*
2. McGovern VJ. The classification of melanoma and its relationship with prognosis. *Pathology 1970; 2:85-98*

3. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasain A. (Eds.). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology & Genetics of Skin tumours. *IARC Press, Lyon, 2006*
4. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol 2009; 27:6199-206*
5. Gershenwald JE, Soong SJ, Balch CM. 2010 TNM staging system for cutaneous melanoma and beyond. *Ann Surg Oncol 2010; 17:1475-77*
6. Soong SJ, Ding S, Coit D, Balch CM, Gershenwald JE, Thompson JF, Gimotty P. Predicting survival outcome of localized melanoma: an electronic prediction tool based on the AJCC melanoma database. *Ann Surg Oncol 2010; 17:2006-14*
7. Scolyer RA, Murali R, Satzger I, Thompson JF. The detection and significance of melanoma micrometastases in sentinel nodes. *Surg Oncol 2008; 17:165-74*
8. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet 2005; 365:687-701*
9. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Brocker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med 2005; 353:2135-47*
10. Bauer J, Buttner P, Murali R, Okamoto I, Kolaitis NA, Landi MT, Scolyer RA, Bastian BC. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res 2011; 24:345-51*
11. Arkenau HT, Kefford R, Long GV. Targeting BRAF for patients with melanoma. *Br J Cancer 2010; 104:392-8*
12. Flaherty KT, Hodi FS, Bastian BC. Mutation-driven drug development in melanoma. *Curr Opin Oncol 2010; 22:178-183*
13. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med 2010; 363:809-19*
14. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, Hughes TM, Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol 2011; 29:1239-46*
15. Broekaert SM, Roy R, Okamoto I, van den Oord J, Bauer J, Garbe C, Barnhill RL, Busam KJ, Cochran AJ, Cook MG, Elder DE, McCarthy SW, Mihm MC, Schadendorf D, Scolyer RA, Spatz A, Bastian BC. Genetic

and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res 2010; 23:763-70*
16. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol 2006; 24:4340-46*
17. Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, Bastian BC. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med 2008; 5:941-52*
18. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg 1970; 172 902-8*
19. Clark WH Jr, Elder DE, DuPont G IV, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D et al. Model predicting survival in stage I melanomabased on tumor progression. *J Natl Cancer Inst 1989; 81:1893-1904*
20. Elder DE, Murphy GF (1991) Atlas of Tumor Pathology: Melanocytic tumors of the skin. Third series. Rosai J, (Ed).Washington D.C. *Armed Forces Institute of Pathology: pp 103-205*
21. Elder DE, Guerry D IV, Epstein MN, Zehngebot L, Lusk E, VanHorn M et al. Invasive malignant neoplasms lacking competence for metastasis. *Am J Dermatopathol 1984; 6 (Suppl 1):55-61*
22. Murali R, Shaw HM, Lai K, McCarthy SW, Quinn MJ, Stretch JR, Thompson JF, Scolyer RA. Prognostic factors in cutaneous desmoplastic melanoma: a study of 252 patients. *Cancer 2010; 116:4130-38*
23. Scolyer RA, Prieto VG. Melanoma pathology: important issues for clinicians involved in the multidisciplinary care of melanoma patients. *Surg Oncol Clin N Am 2011; 20:19-37*
24. Chen JY, Hruby G, Scolyer RA, Murali R, Hong A, Fitzgerald P, Pham TT, Quinn MJ, Thompson JF. Desmoplastic neurotropic melanoma: a clinicopathologic analysis of 128 cases. *Cancer 2008; 113:2770-8*
25. Scolyer RA, Thompson JF, Stretch JR, Sharma R, McCarthy SW. Pathology of melanocytic lesions: new, controversial, and clinically important issues. *J Surg Oncol 2004; 86:200-11*
26. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma in the era of molecular profiling. *Lancet 2009; 374:362-5*
27. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin, H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature 2002; 417:949-54*

28. Garrido MC, Bastian BC. KIT as a therapeutic target in melanoma. *J Invest Dermatol 2010; 130:20-7*
29. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, Simpson EM, Barsh GS, Bastian BC. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature 2009; 457:599-602*
30. Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Vemula S, Wiesner T, Obenauf AC, Wackernagel W, Green G, Bouvier N, Sozen MM, Baimukanova G, Roy R, Heguy A, Dolgalev I, Khanin R, Busam K, Speicher MR, O'Brien J, Bastian BC. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med 2010; 363:2191-99*
31. Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced cell senescence e halting on the road to cancer. *N Engl J Med 2006; 355:1037-46*
32. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA: BRIM-3 Study Group. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med 2011; 364:2507-16*
33. Dadras SS. Molecular Diagnostics in Melanoma. Current Status and Perspectives. *Arch Pathol Lab Med 2011;135:860-9*

8.0 STADIAZIONE

Il melanoma cutaneo è in rapido e costante aumento di incidenza in tutto il mondo occidentale (1). Pertanto, un sempre maggior numero di persone viene sottoposto a numerose indagini allo scopo di definire la diffusione della malattia al momento della diagnosi e successivamente nel *follow-up*.
La sopravvivenza a 5 anni di un paziente affetto da melanoma che ha sviluppato metastasi a distanza è del 5-15% e la sopravvivenza media di un paziente in stadio IV è di 7-9 mesi con un'ampia differenza fra M1 e M3 (2,3) Un'accurata stadiazione, per diagnosticare metastasi locali o a distanza, è quindi necessaria al momento della diagnosi, per assicurare un trattamento appropriato ed ottimizzare la prognosi. Infatti, una metastasi diagnosticata precocemente può essere trattata chirurgicamente, con un aumento della sopravvivenza del paziente (4,5). La chirurgia è, al momento, il solo trattamento delle metastasi che si è rivelato utile nel migliorare significativamente la prognosi (6).
In ambito scientifico non c'è ancora consenso sulle modalità investigative da impiegare per la stadiazione del melanoma e sulle indicazioni stesse delle diverse metodiche, nonostante gli alti costi che queste procedure comportano per i sistemi sanitari di tutto il mondo (7).
Nuove tecniche di *imaging* sono state introdotte nell'ultima decade ad affiancare l'ecografia, la radiografia, la TC e l'RMN. La FDG-PET (Fluorodeossiglucosio-Tomografia ad Emissione di Positroni), ad esempio, è divenuta un esame estremamente importante in grado di identificare metastasi in base al loro aumentato metabolismo glucidico.
Oggi, dal 50% al 70% dei melanomi viene diagnosticata in fase precoce con un rischio di recidiva e/o diffusione inesistente (melanoma *in situ*) o molto basso (stadio IA) (8). Quindi è importante identificare quali indagini di stadiazione sono indicate per questi pazienti e quali sono invece da evitare, in quanto inutili.
La maggioranza delle raccomandazioni per la stadiazione dei pazienti con melanoma in stadio IA propende per il solo esame clinico nei pazienti asintomatici (9).
Tuttavia, nelle Linee Guida dell'*American Society of Plastic Surgeons* si raccomanda di considerare per tutti i pazienti con melanoma, senza

specificare a quale stadio, esami bioumorali (LDH e FA) e radiografia del torace (10).
Semplici esami quali l'ecografia dei linfonodi regionali e dell'area del tumore primitivo, l'ecografia addominale e la radiografia del torace sono proposte da alcuni per avere un quadro al momento zero, da utilizzare per il successivo *follow-up* (8).
Uno studio prospettico su un elevato numero di pazienti non ha evidenziato alcuna superiorità degli esami di *imaging* rispetto al semplice esame clinico in pazienti a basso rischio (11).
Per pazienti con malattia di maggiore gravità, stadi IB-IIA-IIB, viene raccomandato da alcuni Autori un approfondimento delle indagini con ecografia ai linfonodi regionali e ricerca della proteina S100B, mentre esami di *imaging* non sono raccomandati per pazienti con proteina S100 B normale (11,12).
In uno studio su un numero significativo di soggetti, solo 1 su 876 pazienti affetti da melanoma in stadio IB e II furono evidenziate metastasi con la semplice radiografia del torace, mentre in 131 casi (15%) emersero falsi positivi che costrinsero ad ulteriori indagini. Pertanto, si sottolinea l'inutilità della radiografia del torace nell'evidenziare metastasi, in pazienti asintomatici (13).
Le Linee Guida della Società Americana di Chirurgia Plastica considerano per "pazienti con malattia più avanzata", senza una più precisa definizione di cosa si intenda con questo termine, l'esecuzione di test ematici quali LDH, FA, Proteina S100 B, radiografia del torace, TC addominale, PET, RMN cerebrale, *screening* di marcatori molecolari con RT-PCR (10).
Al contrario, le Linee Guida Australiane e Neozelandesi non consigliano alcun accertamento supplementare all'esame clinico completo, per gli stadi I e II in pazienti asintomatici (9).
I linfonodi regionali vengono valutati nei pazienti con melanoma di spessore > 1 mm analizzando il Linfonodo Sentinella (LS), cioè il primo linfonodo drenante l'area sede della neoplasia.
La ricerca del LS, introdotta negli anni '90, è considerata oggi la procedura *standard*. Lo stato istopatologico del LS è uno dei più significativi fattori prognostici nei pazienti con melanoma (14,15). Finora, il suo significato rimane unicamente prognostico, in quanto nessuno studio randomizzato ha dimostrato un beneficio in termini di sopravvivenza o di intervallo libero da malattia dei pazienti sottoposti a ricerca del LS e ad eventuale linfoadenectomia, in caso di positività dello stesso (16).

Uno studio di Sanki et al. (17) confronta la tecnica del LS con l'ecografia dei linfonodi per la ricerca di metastasi. La sensibilità di un'ecografia ad alta risoluzione risulta solo del 24,3%.
La combinazione ecografia ed agoaspirato, in un gruppo selezionato di pazienti ad alto rischio di metastasi, elimina la necessità della biopsia del LS, quando si identificano pre-operatoriamente metastasi linfonodali. In questi casi, generalmente, è indicata una linfoadenectomia (18-20).
Alcuni studi esaminano l'utilità di eseguire approfondimenti d'indagine, per evidenziare eventuali metastasi prima di eseguire una linfoadenectomia, per eventuali variazioni di strategia terapeutica, in caso di metastasi a distanza.
In uno studio su 270 pazienti con LS positivo, solo 5 (1,9%) avevano anche metastasi a distanza evidenziate dalla TC. Il tumore primitivo di questi era ulcerato, con spessore medio di 5 mm (21).
Un altro studio conclude che pazienti con LS positivo non devono eseguire una PET prima della linfadenectomia, in quanto su 30 pazienti con melanoma e LS positivo, nessuno ha evidenziato positività alla PET (22).
Per contro, altri Autori raccomandano l'impiego della PET di *routine* in pazienti con LS positivo, prima della linfadenectomia.
Ad esempio, metastasi furono evidenziate dalla PET in 4 (12%) di 33 pazienti con LS positivo (23). Queste metastasi furono evidenziate unicamente dalla PET e non da altre metodiche diagnostiche, quali esame clinico, radiografie e test ematici.
Uno studio di meta-analisi (24) su 10.528 pazienti (74 studi ritenuti validi), eseguito per confrontare l'utilità dell'ecografia, della TC, della PET e della PET-TC nella stadiazione dei pazienti affetti da melanoma, conclude che l'ecografia è superiore alle altre metodiche nel rilevare metastasi ai linfonodi, mentre la PET-TC è superiore nel rilevare metastasi a distanza. Nondimeno si sottolinea la bassa specificità di quest'ultima metodica con un notevole numero di falsi positivi, per cui nei pazienti a basso rischio di metastasi il suo impiego non è previsto senza precise indicazioni cliniche.
Un altro studio di meta-analisi (25) su 2.905 pazienti mostra una sensibilità ed una specificità complessiva della PET-TC rispettivamente dell'83% e dell'85% e conclude che negli stadi iniziali della malattia la PET mostra una moderata utilità. La PET-TC ha dimostrato migliori risultati della semplice PET.

Uno studio del *National Institute for Health Research* conclude che la PET è un'utile tecnica di stadiazione nei pazienti con melanoma in stadio III e IV, in particolare per lo studio dei tessuti molli, dei linfonodi e delle metastasi viscerali. Solo alcuni pazienti in stadi iniziali possono trarre beneficio dalla PET.
Un altro lavoro confronta la sensibilità e la specificità nell'identificare metastasi della RMN *total-body* con protocollo multicontrasto e della PET-TC. Su 35 pazienti con melanoma in fase avanzata, studiati con entrambe le metodiche, la RMN *total body* mostra una sensibilità ed una specificità rispettivamente dell'82% e 97%, mentre la PET-TC del 72,8% e del 92,7%. Inoltre, l'aggiunta di una particolare sequenza (*Diffusion Weighted*, DW) alla RMN ha permesso l'identificazione di 14 ulteriori metastasi (20%). La conclusione dell'Autore è che la RMN multi-contrasto, includente la sequenza DW, è la metodica più accurata per l'identificazione delle metastasi particolarmente a livello del fegato, midollo osseo e sottocutaneo (26).
Mansour et al. (27) dalla revisione di 342 pazienti affetti da melanoma esaminati con PET-CT concludono che la metodica è poco indicata per lo studio di eventuali metastasi alle estremità, in quanto l'identificazione di metastasi a livello muscolare e/o osseo spesso ha creato confusione.
L'uso inappropriato di nuove tecniche di *imaging* nella stadiazione del melanoma, che comporta un innalzamento dei costi per il sistema sanitario nazionale senza migliorare la qualità delle cure, è un fatto reale in tutti i Paesi Occidentali. Esso viene attribuito in parte ai Medici che, per scarsa competenza (28) o per timore delle complicanze giudiziarie di una mancata diagnosi (29), prescrivono esami di *imaging* inappropriati per il caso clinico. In parte, viene ascritto ai pazienti che, affetti da un tumore, spesso si aspettano e chiedono la prescrizione di determinati accertamenti estesi a tutto il corpo (30).
Il risultato negativo di un'indagine diagnostica, anche se non necessaria, rassicura sia il paziente sia il Medico senza che ne vengano percepite le conseguenze negative come l'inutile esposizione a radiazioni ionizzanti o l'eventuale innesco di ulteriori percorsi diagnostici inutili per chiarire immagini di difficile interpretazione, oltre al già citato aumento delle spese a carico della collettività.
Le Linee Guida Australiane e Neozelandesi (9) non suggeriscono alcun accertamento nemmeno in caso di LS positivo, a meno che il paziente non presenti sintomi che facciano sospettare la presenza di metastasi. Solo in caso di malattia loco-regionale, quando l'eventuale

presenza di metastasi modifichi la successiva terapia, sono consigliate TC del torace, dell'addome e della pelvi o PET *total-body*.
In caso di forte sospetto di metastasi linfonodali viene consigliato un agoaspirato con guida ecografica o radiologica per confermare lo stadio III della malattia (9).
Sono giustificati accertamenti quali LDH, TC, RMN, PET, in caso di sintomi che facciano sospettare metastasi. Dopo la conferma di melanoma metastatico, non sono indicati ulteriori accertamenti, a meno che non sia programmato un intervento chirurgico ed il ritrovamento di altre metastasi modifichi l'atteggiamento terapeutico.
Le Linee Guida del Regno Unito, riviste nel 2010 (31), suggeriscono che non esiste indicazione per accertamenti di *imaging* (radiografie, TC, RMN, PET) nel melanoma in stadio I e II. Ribadiscono la superiorità dello studio del LS rispetto a tutte le altre metodiche di indagine dei linfonodi. La seconda metodica di studio più indicata è l'agoaspirato con guida ecografica. Approfondimenti con TC dopo LS positivo e prima di eseguire la linfoadenectomia hanno un'utilità molto scarsa. Pertanto, ciò deve essere fatto dopo discussione con il paziente su preciso motivo.
Nei pazienti in stadio III, con linfonodi clinicamente evidenti, è indicata una TC cerebrale, del torace, dell'addome superiore ed inferiore, prima di programmare una linfoadenectomia od una chemioterapia regionale.
Nello stadio IV è suggerita una TC cerebrale e *total body,* mentre la PET-TC non è definita rilevante.
All'opposto di queste considerazioni giunge il lavoro di *Consensus Statement* dei Centri Catalani e Baleari per il Melanoma (32), che fornisce la seguente indicazioni: oltre all'esame clinico e l'anamnesi, devono essere eseguiti i seguenti accertamenti in tutti i casi di melanoma invasivo (tutti, escluso melanoma *in situ*):

- emocromo ed esami ematici inclusa FA, GGT e LDH. Determinazione della proteina S100B, RT-PCR, Tirosinasi nell'RNA messaggero;
- Rx del torace in due proiezioni.

In caso di pazienti in stadio IA, IB, IIA, non è indicato alcun altro accertamento, anche se qualche ospedale raccomanda l'ecografia addominale negli stadi IB e IIA. In caso di sospetto clinico di metastasi, ogni accertamento atto a chiarire il sospetto clinico è legittimato.

Nei pazienti in stadio IIB, IIC, III, sono raccomandate ulteriori indagini anche in assenza di sintomi. In particolare:

- studio del LS;
- TC toraco-addominale (o TC toracica ed ecografia addominale);
- RMN o TC cerebrale;
- TC cervicale in caso di tumore localizzato nel distretto testa-collo;
- Scintigrafia ossea (opzionale).

La PET è prescritta solo per pazienti con metastasi a distanza e solo quando i risultati dell'esame possono modificare l'*iter* terapeutico. Si specifica, peraltro, che con l'affinamento diagnostico e la maggiore disponibilità della PET, sarà possibile valutarne caso per caso l'utilità.
Le Linee Guida del *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) (versione 1.2012) (33) raccomandano di non eseguire TC, RMN, PET, nei pazienti con melanoma localizzato. L'indicazione è condivisa anche dalle Linee Guida del *National Institute of Health* (NIH) (34). Anche in pazienti asintomatici in stadio IB-IIA-IIB-IIC, non sono consigliate TC, PET, RMN, per lo scarso numero di metastasi occulte diagnosticate da queste metodiche. Nei pazienti in stadio IIB e IIC la radiografia del torace è opzionale.
Nei pazienti in stadio III, viene lasciata ai clinici la discrezionalità su quali accertamenti impiegare. Nei pazienti in stadio III con linfonodi clinicamente positivi, viene suggerita una conferma della malattia con un agoaspirato o la biopsia aperta di un linfonodo iperplastico. Viene anche raccomandata una TC addominale.
Anche nei pazienti in stadio III con metastasi *in transit* è necessaria la conferma istologica della metastasi così come nei pazienti in stadio IV con agoaspirato o biopsia. Consigliate TC toraco-addominale o PET e RMN cerebrale in caso di segni anche minimi di coinvolgimento del sistema nervoso o in caso il risultato dell'esame possa modificare l'*iter* terapeutico. E' infine raccomandato eseguire LDH sierico ed altri esami siero-ematici a discrezione del curante.
In un lavoro retrospettivo monoistituzionale, Sawyer et al. (35) concludono che solo in 1 su 132 (0,7%) pazienti con melanoma in stadio IIB o più avanzato, TC al torace, all'addome ed all'encefalo eseguite di routine per stadiazione identificarono una metastasi occulta, causando un cambio di strategia terapeutica. Pertanto, la TC non è indicata a meno di pazienti sintomatici per metastasi.

In un recente lavoro di revisione della letteratura, Ho Shon et al. (36) concludono che la linfoscintigrafia e la biopsia del LS sono oggi il *gold standard* per lo studio dei linfonodi, con un'evidenza di livello I. Un livello di evidenza III dimostra invece la superiorità dell'ecografia rispetto all'esame clinico nello studio dei linfonodi regionali. L'ecografia è utile per lo studio dei linfonodi regionali, ma il suo ruolo in relazione alla linfoscintigrafia ed alla biopsia del LS è ancora oggetto di studio. Può essere dirimente a volte, quando vi sia il sospetto clinico di metastasi linfonodali. Per lo studio delle metastasi viscerali, invece, la FDG-PET ed ancor più la PET-TC, è l'esame più indicato sebbene il livello di evidenza sia meno forte del precedente (livello IV). Questo esame è indicato negli stadi III e IV e nelle recidive di melanoma. In alcune sedi, quali il cervello ed i polmoni, la TC e la RMN hanno un ruolo importante e complementare alla PET. La classificazione in stadi clinici usata in questo lavoro, ormai universalmente accettata ed impiegata nella maggioranza della letteratura scientifica e nelle Linee Guida Internazionali (Tabella 1 e 2), è quella dell'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC), edizione 2010 (37).

In conclusione, da quanto prima riportato, risulta evidente la difficoltà di trarre delle indicazioni univoche sugli esami ematochimici e strumentali da utilizzare per la stadiazione dei pazienti con melanoma. Un'indicazione generale che emerge dalla letteratura è quella di modulare gli esami in rapporto al rischio e/o alla presenza di metastasi. Nessun esame di stadiazione dovrebbe essere eseguito nei pazienti con melanoma *in situ*. Un'accurata visita dermatologica ai fini di escludere ulteriori lesioni concomitanti è considerata sufficiente. L'ecografia dei linfonodi dei bacini di drenaggio, che in linea di massima dovrebbero essere bilaterale, è dotata di una discreta sensibilità e di un'ottima specificità, se associata alla FNAC ecoguidata, e può trovare indicazione prima della biopsia del linfonodo sentinella. Molto controverso è il ruolo della radiografia *standard* del torace e dell'ecografia addominale in presenza di rischio intermedio (T2-4a), mentre sembra delinearsi un certo consenso sull'indicazione alla TC *total-body* o alla PET-TC nei casi ad alto rischio di metastasi a distanza (T4b e/o presenza di metastasi linfonodali clinicamente evidenti). Infine, tra gli esami ematochimici, l'indicazione al dosaggio del LDH nei pazienti con metastasi (o ad alto rischio) è largamente condivisa, essendo in grado di stratificare il rischio di morte in questo tipo di pazienti.

Tabella 1. Melanoma cutaneo: classificazione TNM (AJCC)

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

NA: non applicabile; LDH: lactate dehydrogenase;
* le micrometastasi sono diagnosticate dopo biopsia del linfonodo sentinella.
† le macrometastasi sono definite come metastasi linfonodali rilevate clinicamente e confernate patologicamente

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

Tabella 2 Raggruppamento per stadio anatomico per il melanoma cutaneo

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

* la stadiazione clinica comprende la microstadiazione del melanoma primitivo e la valutazione clinica, radiologica delle metastasi. Per definizione, potrebbe essere utilizzata dopo escissione completa del tumore primitivo con accertamento clinico per metastasi regionali ed a distanza.

† la stadiazione patologica comprende la microstadiazione del melanoma primitivo e le informazioni patologiche riguardanti i linfonodi regionali dopo parziale (biopsia del linfonodo sentinella) o completa linfoadenectomia. Gli stadi 0 o IA non richiedono valutazione patologica dei linfonodi.

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

BIBLIOGRAFIA

1. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet 2005; 365:687-701*
2. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol 2001; 19(6): 3635-48*
3. Miller AJ, Mihm MC, Melanoma. *New Engl J Med 2006; 355:51-65*
4. Wong SL, Coit DG. Role of surgery in patients with stage IV melanoma. *Curr Opin Oncol 2004; 16:155-60*
5. Sharpless SM, Das Gupta TK. Surgery for metastatic melanoma. *Semin Surg Oncol 1998; 14:311-8*
6. Brand CU, Ellwanger U, Stroebel W, Meier F, Schlagenhauff B, Rassner G, Garbe C. Prolonged survival of 2 years or longer for patients with disseminated melanoma. An analysis of related prognostic factors. *Cancer 1997; 79(12):2345-53*
7. Saiag P, Bosquet L, Guillot B, Verola O, Avril MF, Bailly C, Cupissol D, Dalac S, Danino A, Dréno B, Grob JJ, Leccia MT, Renaud-Vilmer C. Management of adult patients with cutaneous melanoma without distant metastasis. 2005 update of French Standards, Options and raccomandations guidelines. Summary report. *Eur J Dermatol 2007; 17(4):325-31*
8. Forschner A, Eigentler TK, Pflugfelder A, Leiter U, Weide B, Held L, Meier F, Garbe C. Melanoma staging: facts and controversies. *Clin Dermatol 2010; 28:275-80*
9. Appropriate Investigations. In: Australian Cancer Network Melanoma Guidelines Revision Working Party. Clinical Practice Guidelines for the management of melanoma in Australia and New Zealand Wellington (NZ). *The Cancer Council Australia, Australian Cancer Network, Sydney and New Zealand Guidelines Group 2008; p. 55-62* (available in PDF from the New Zealand Guidelines Group Web site)
10. American Society of Plastic Surgeons. Evidence-based clinical practice guideline: treatment of cutaneous melanoma. *Arlington Heights (IL): American Society of Plastic Surgeons 2007; May. 14 p.*
11. Garbe C, Paul A, Kohler-Späth H, Ellwanger U, Stroebel W, Schwarz M, Schlagenhauff B, Meier F, Schittek B, Blaheta HJ, Blum A, Rassner G. Prospective evaluation of a follow-up schedule in cutaneous melanoma patients: reccomandations for an effective follow-up strategy. *J Clin Oncol 2003; 21(3):520-9*
12. Bishop JA, Corrie PG, Evans J, Gore ME, Hall PN, Kirkham N, Roberts DL, Anstey AV, Barlow RJ, Cox NH; Melanoma Study Group;

British Association of Dermatologists. UK guidelines for the management of cutaneous melanoma. *Br J Plast Surg 2002; 55(1):46-54*
13. Terhune MH, Swanson N, Johnson TM. Use of chest radiography in the initial evaluation of patients with localized melanoma. *Arch Dermatol 1998; 134:569-72*
14. Reintgen DS. Regional nodal surgery for melanoma impacts recurrence rates and survival. *Ann Surg Oncol 2000;7:80-1*
15. Gershenwald JE, Thompson W, Mansfield PF, Lee JE, Colome MI, Tseng CH, Lee JJ, Balch CM, Reintgen DS, Ross MI. Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: the prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients. *J Clin Oncol 1999; 17(3):976-83*
16. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Elashoff R, Essner R, Nieweg OE, Roses DF, Hoekstra HJ, Karakousis CP, Reintgen DS, Coventry BJ, Glass EC, Wang HJ; MSLT Group. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma *New Engl J med 2006; 355(13):1307-17*
17. Sanki A, Uren RF, Moncrieff M, Tran KL, Scolyer RA, Lin HY, Thompson JF. Targeted high-resolution ultrasoundis not an effective substitute for sentinel lymph node biopsy in patients with primary cutaneous melanoma. *J Clin Oncol 2009; 27(33):5614-19*
18. Hocevar M, Bracko M, Pogacnik A, Vidergar-Kralj B, Besic N, Zgajnar J, Music MM. The role of preoperative ultrasonography in reducing the numeber of sentinel lymph node procedures in melanoma. *Melanoma res 2004; 14(6):533-36*
19. Deurloo EE, Tanis PJ, Gilhuijs KG, Muller SH, Kröger R, Peterse JL, Rutgers EJ, Valdés Olmos R, Schultze Kool LJ. Reduction in the number of sentinel lymph node procedures by preoperative ultrasonography of the axilla in breast cancer. *Eur J Cancer 2003; 39(8):1068-73*
20. Motomura K, Inaji H, Komoike Y, Kasugai T, Nagumo S, Hasegawa Y, Noguchi S, Koyama H. Gamma probe and ultrasonographically-guided fine-needle aspiration biopsy of sentinel lymph node in breast cancer patients. *Eur J Surg Oncol 2001; 27(2):141-45*
21. Aloia TA, Gershenwald JE, Andtbacka RH, Johnson MM, Schacherer CW, Ng CS, Cormier JN, Lee JE, Ross MI, Mansfield PF. Utility of computed tomography and magnetic resonance imaging staging before completion lymphadenectomy in patients with sentinel lymph node positive melanoma. *J Clin Oncol 2006; 24(18):2858-65*
22. Constantinidou A, Hofman M, O'Doherty M, Acland KM, Healy C, Harries M. Routine positron emission tomography and positron emission tomography/computed tomography in melanoma staging with positive sentinel node biopsy is of limited benefit. *Melanoma Res 2008; 18:56-60*

23. Horn J, Lock-Andersen J, Sjostrand H, Loft A. Routine use of FDG-PET scans in melanoma patients with positive sentinel node biopsy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging 2006; 33:887-92*
24. Xing Y, Bronstein Y, Ross MI, Askew RL, Lee JE, Gershenwald JE, Royal R, Cormier JN. Contemporary diagnostic imaging modalities for the staging and surveillance of melanoma patients: a meta-analysis. *JNCI 2011;103 (2):129-42*
25. Krug B, Crott R, Lonneux M, Baurain JF, Pirson AS, Vander Borght T. Role of PET in the initial staging of cutaneous malignant melanoma: systematic review. *Radiology 2008; 249(3):836-44*
26. Laurent V, Trausch G, Bruot O, Olivier P, Felblinger J, Regent D. Comparative study of two whole-body imaging techniques in the case of melanoma metastases: advantage of multi-contrast MRI examination including a diffusion-weighted sequence in comparison with PET-CT *Eur J Radiol 2010; 75:376-83*
27. Mansour III AA, Kelly MC, Hatmaker AR, Holt GE, Schwarzt HS. Verification of musculoskeletal PDG-PET-CT findings performed for melanoma staging *Ann Surg Oncol 2010; 17:1144-51*
28. Lysdahl KB, Hofmann BM. What causes increasing and unnecessary use of radiological investigations? A survey of radiologists' perceptions. *BMC Health Serv Res 2009; 9:155*
29. Studdert DM, Mello MM, Sage WM, DesRoches CM, Peugh J, Zapert K, Brennan TA. Defensive medicine among high-risk specialist physicians in a volatile malpractice environment. *JAMA 2005; 293(21):2609-17*
30. Wilson IB, Dukes K, Greenfield S, Kaplan S, Hillman B. Patient's role in the use of radiology testing for common office practice complaints *Arch Intern Med 2001; 161(2):256-63*
31. Marsden JR, Newton-Bishop JA, Burrows L, Cook M, Corrie PG, Cox NH, Gore ME, Lorigan P, MacKie R, Nathan P, Peach H, Powell B, Walker C. British Association of Dermatologists Clinical Standards Unit. Revised UK guidelines for the management of cutaneous melanoma 2010. *Br J Dermatol 2010; 163(2):238-56*
32. Mangas C, Paradelo C, Puig S, Gallardo F, Marcoval J, Azon A, Bartralot R, Bel S, Bigatà X, Curcò N, Dalmau J, del Pozo LJ, Ferrandiz C, Formigon M, Gonzales A, Just M, Llambrich A, Llistosella E, Malvehy J, Martì RM, Nogùes ME, Pedragosa R, Rocamora V, Sàbat M, Salleras M. Initial evaluation, diagnosis, staging, treatment, and follow-up of patients with primary cutaneous malignant melanoma. Consensus statement of the Network of Catalan and Balearic Melanoma Centers. *Actas Dermosifilogr 2010; 101(2):129-42*
33. National Comprehensive Cancer Network guidelines (available at www.nccn.com)
34. NIH Consensus Statement. After treatment of early melanoma should patients and family members be followed? Why and How?

NIH Consens Statement 1992 Jan 27-29; 10(1):1-26 (available at www.mpip.org/articles/88txt.html)
35. Sawyer A, McGoldrick RB, Mackey SP, Allan R, Powell B. Does staging computered tomography change management in thick malignant melanoma? *JPRAS 2009; 62:453-56*
36. Ho Shon IA, Chung DKV, Saw RPM, Thompson JF. Imaging in cutaneous melanoma: Review article. *Nucl Med Commun 2008; 29(10):847-76*
37. AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition 2010, published by Springer Science and Business Media LLC (SBM) *www.springer.com*

9.0 FATTORI PROGNOSTICI E PREDITTIVI DI RISPOSTA CLINICA

9.1 Marcatori prognostici istopatologici
9.2 Marcatori prognostici bio-molecolari
9.3 Marcatori sierici
9.4 Fattori predittivi di risposta a terapia

La sopravvivenza dei pazienti affetti da melanoma cutaneo dipende principalmente dallo stadio al momento della diagnosi.
Benché anche in questa neoplasia numerosi sono i marcatori molecolari in fase di studio, i fattori morfo-patologici rappresentano al momento i principali indicatori di prognosi, validati e consolidati.
L'attuale sistema di classificazione del melanoma cutaneo permette di predire, con notevole accuratezza, l'andamento clinico anche nei casi diagnosticati in una fase precoce della malattia.
Tuttavia, considerando che circa il 5% dei pazienti affetti da melanoma con spessore ≤ 1 mm può andare incontro a processi di metastatizzazione, la possibilità di disporre di marcatori molecolari specifici appare di notevole importanza clinica. Identificare il sottogruppo di pazienti a rischio di progressione al momento della diagnosi iniziale consentirebbe una pianificazione terapeutica corretta *ab initio*, con conseguente miglioramento della prognosi (1). Dal punto di vista isto-patologico, la stadiazione del melanoma è stata definita nella classificazione dell'*American Joint Commettee on Cancer* (AJCC) del 2002, rielaborata nell'edizione del 2009 e lievemente modificata nel 2010, con l'inserimento dell'attività mitotica nei fattori prognostici validati in melanomi al primo stadio (spessore sottile) (2).
Le attuali conoscenze ci hanno insegnato che le alterazioni molecolari coinvolte nello sviluppo e nella progressione del melanoma sono particolarmente complesse e coinvolgono un'ampia serie di processi cellulari quali la proliferazione, l'apoptosi, la migrazione e l'invasione.
Le implicazioni cliniche di tale eterogeneità molecolare sono principalmente due: la necessità di definire un profilo di bio-marcatori prognostici, soprattutto negli stadi iniziali della malattia, potenziando i parametri convenzionali e l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici che possano condurre alla messa a punto di trattamenti personalizzati.

9.1 Marcatori prognostici istopatologici

Il melanoma cutaneo maligno si sviluppa in tre stadi sequenziali: fase a crescita orizzontale, fase a crescita verticale e metastatizzazione. La prognosi in ciascuna fase è solo parzialmente definibile mediante parametri classici, quali il tipo istologico, il livello di invasione (livello di Clark), lo spessore secondo Breslow, la presenza o meno di ulcerazione, la conta mitotica e lo stato del linfonodo sentinella.

Tipo istologico
Il melanoma a diffusione superficiale ha tendenzialmente prognosi migliore nei casi a crescita orizzontale, dove l'invasione dermica può essere minima con scarsa capacità infiltrativa delle cellule e spesso assenza di mitosi. Nella fase a crescita verticale, le lesioni tendono a formare aree nodulari nel derma papillare e reticolare.
In tal caso, lo spessore delle lesioni è generalmente elevato, associato ad un notevole incremento dell'attività mitotica con conseguente aumento del rischio di metastatizzazione e del peggioramento della prognosi.

Livello di invasione e spessore secondo Breslow
Il livello di invasione (livello di Clark), basato sulla valutazione dell'infiltrazione nel derma delle cellule melanomatose, è stato sempre considerato il migliore fattore prognostico nel melanoma.
Tale importante parametro morfologico è associato anche alla valutazione dello spessore secondo Breslow, che misura la profondità della neoplasia in millimetri a partire dallo stato granuloso dell'epidermide fino all'ultima cellula melanomatosa visibile. Tuttavia, il livello di invasione di Clark e lo spessore di Breslow tendono generalmente a sovrapporsi, ovvero maggiore è il livello di invasione, maggiore sarà lo spessore del melanoma. Il significato biologico dello spessore del melanoma non è ancora del tutto chiarito. Nel suo lavoro originale (1970), Breslow (3) considerò sia lo spessore sia l'area del tumore come variabili prognostiche che potevano riflettere in modo univoco l'aggressività del melanoma. In realtà, non è stato confermato che melanomi grandi abbiano prognosi più infausta di melanomi di piccola area con il medesimo spessore.
La stesura dell'AJCC *staging* (2) per il melanoma cutaneo ha ulteriormente confermato il significato prognostico dello spessore di Breslow, indicando che pazienti con melanoma T1 (≤ 1,00 mm)

hanno una sopravvivenza globale a 10 anni del 92% contro il 50% nei pazienti con melanoma T4 (≥ 4,00 mm).

Ulcerazione e indice mitotico

La presenza o meno di ulcerazione è stata inserita dall'AJCC tra i principali fattori prognostici e suddivide ulteriormente tutte le classificazioni secondo lo spessore di Breslow (T1a e T1b, T2a e T2b ecc.).

E' stato ampiamente descritto che pazienti con melanoma a crescita verticale ed indice mitotico elevato hanno un aumentato rischio di progressione rispetto a pazienti con basso indice mitotico.

Dati elaborati, utilizzando l'AJCC *Melanoma Staging Database*, hanno dimostrato una correlazione statisticamente significativa tra elevato indice mitotico e sopravvivenza globale ($p<0,0001$).

In un'analisi fattoriale condotta su 10.233 pazienti con melanoma localizzato, l'indice mitotico rappresenta il secondo fattore di rilevanza prognostica, subito dopo lo spessore (χ^2 79.1; $p<0,0001$).

Sulla base di questi dati, nel 2010 l'AJCC (*Seventh Edition Melanoma Staging System*) ha inserito, per la determinazione della stadiazione finale, la valutazione dell'indice mitotico nei melanomi con spessore < 1 mm (T1). In particolare, la presenza di mitosi ≥ 1/mm^2 rappresenta un criterio primario, che sostituisce il livello di Clark, per la classificazione T1b del melanoma. Tali pazienti diventano quindi eleggibili per la metodica del linfonodo sentinella (4).

In tale contesto, alcuni Autori hanno dimostrato che il Ki-67, un marcatore di proliferazione facilmente rilevabile con metodiche immunoistochimiche (IHC), presente in tutti i nuclei delle cellule non quiescenti dalla fase G1 alla mitosi, può rappresentare, a livello prognostico, un valido complemento dell'indice mitotico morfologico. La valutazione dell'attività mitotica utilizzando un marcatore biologico che fornisce risultati riproducibili, quantificabili in modo oggettivo con sistemi automatizzati di analisi, potrebbe aprire uno scenario innovativo rappresentando, se validato, il primo marcatore biologico introdotto nei criteri di stadiazione del melanoma (5).

Linfonodo sentinella

La biopsia del linfonodo sentinella (LS), introdotta da Morton nel 1992 (6), è ormai ampiamente accettata come metodo di elevata accuratezza diagnostica per l'identificazione anche di micrometastasi, in pazienti affetti da melanoma cutaneo. LS, identificato mediante

linfoscintigrafia, viene definito come primo linfonodo drenante dell'area tumorale e come tale presenta un rischio più elevato di metastatizzazione.
Una volta asportato, il LS (o i linfonodi sentinella, se sono stati reperiti più linfonodi) viene inviato al patologo in formalina neutra tamponata al 10%. Il linfonodo viene tagliato in 2 metà in corrispondenza dell'ilo, lungo l'asse maggiore e le 2 metà del linfonodo vengono suddivise in modo da eseguire uno o più prelievi di 1-2 mm di spessore, in relazione alle dimensioni del linfonodo. Tutti i prelievi vengono inclusi in paraffina.
L'esame istologico deve essere effettuato su sezioni multiple colorate con ematossilina ed eosina e con colorazioni immunoistochimiche. Tuttavia, al presente, non esiste un protocollo universalmente accettato e non sono ancora stati standardizzati numero di sezioni istologiche, intervallo tra i differenti livelli e marcatori immunoistochimici da utilizzare.
L'EORTC *Melanoma Group* (7,8) raccomanda di tagliare 20 sezioni da ciascuna inclusione, secondo il seguente schema: dopo le prime 3 sezioni (sezioni 1-3), vengono eseguite altre 6 sezioni ad un intervallo di 50 μm (sezioni 4-9); dopo successivi ulteriori intervalli di 50 μm, vengono tagliate altre 3 triplette di sezioni (sezioni 10-12, 13-15, 16-18) ed infine 2 sezioni dopo ulteriore intervallo di 50 μm (sezioni 19-20). Le sezioni 1, 4, 10, 13, 16 e 19 vengono colorate con ematossilina-eosina; le sezioni 2, 5, 11, 14, 17 e 20 vengono destinate a valutazioni immunoistochimiche (proteina S100); le rimanenti 8 sezioni, in bianco, sono tenute di riserva per ulteriori determinazioni immunoistochimiche (MART-1, HMB-45), nei casi di difficile interpretazione.
Si raccomanda di indicare nel referto: i) diametro massimo della metastasi (se ci sono più focolai, il diametro massimo di quello maggiore); ii) sede della metastasi: capsulare, sottocapsulare, parenchimale o mista; iii) presenza di estensione extracapsulare; iv) profondità di invasione secondo Starz (9), che viene misurata dalla superficie interna della capsula linfonodale al punto più profondo di infiltrazione del parenchima linfonodale ed espressa in millimetri; v) presenza di cellule neviche.
La positività del LS nel melanoma varia dal 14% al 30% (10), è significativamente correlata con lo spessore di Breslow e l'ulcerazione e, di conseguenza, è più frequente negli stadi più avanzati.

Numerosi studi hanno dimostrato che il LS rappresenta un importante ed indipendente fattore prognostico significativamente correlato alla sopravvivenza a 5 anni (56% LS positivo vs 90% LS negativo). Tuttavia, la presenza di cellule tumorali nel LS è di particolare rilevanza prognostica, soprattutto in pazienti agli stadi I/II.
Uno studio pubblicato recentemente (11,12) ha evidenziato che la prognosi dei pazienti con LS positivo correla con la grandezza ed il sito della metastasi stessa. Pazienti con metastasi nel LS < 0,1 mm, soprattutto se localizzate esclusivamente in area subcapsulare, hanno una sopravvivenza a 5 anni comparabile a quella di pazienti con LS negativo. Gli Autori suggeriscono di considerare la combinazione dei criteri di Rotterdam (misura del massimo diametro della metastasi in qualunque direzione < 0,1 mm, 0,1-1,0 mm, > 1,0 mm) e di Dewar (definizione della localizzazione della metastasi: subcapsulare o non subcapsulare) importanti parametri predittivi per la positività dei linfonodi non sentinella (12-14).

Linfociti infiltranti il tumore
I linfociti infiltranti il tumore (TILs), nel melanoma, possono indurre una regressione spontanea della neoplasia. La presenza di un'intensa infiltrazione linfocitaria intra-tumorale o disposta a banda continua alla base del melanoma nella sua fase di crescita verticale (*Brisk TIL*) è considerato un fattore prognostico indipendente dallo spessore, dall'indice mitotico, dall'ulcerazione, dal sesso, dall'età e dal sito in cui il melanoma si è sviluppato (15).

9.2 Marcatori prognostici bio-molecolari

Marcatori immunoistochimici
L'immunoistochimica (IHC) utilizzata su tessuto incluso in paraffina è una metodica ampiamente validata e consolidata per la caratterizzazione fenotipica di proteine. In particolare, la recente introduzione della tecnologia del *Tissue Micro Array* (TMA) ha permesso l'analisi e l'osservazione concomitante di un'ampia serie di campioni tessutali processati su un unico vetrino, facilitando in tal modo la valutazione di parametri biologici di potenziale valore prognostico.
In questi ultimi anni, innumerevoli sono stati gli studi che hanno cercato di identificare, applicando metodiche IHC, il biomarcatore "ideale" nel melanoma, analizzato singolarmente od in combinazione

a parametri prognostici convenzionali (16). Tuttavia, tra i molteplici biomarcatori studiati solo una minoranza appare rilevante dal punto di vista clinico ed indipendente sia dallo spessore di Breslow sia da altri parametri istopatologici.
In tale contesto, Rothberg et al. (17) hanno condotto una vasta revisione sistematica ed una meta-analisi della letteratura recente, valutando 1.797 articoli selezionati sulla base di stringenti criteri di inclusione ed esclusione, nell'intento di verificare quali proteine, determinate in IHC, posseggano caratteristiche idonee per diventare validi biomarcatori da introdurre nella pratica clinica. La Tabella 1 riassume, in accordo a Rothberg (17), i biomarcatori IHC più promettenti a livello prognostico.

Tabella 1 Biomarcatori immunoistochimici associati a prognosi sfavorevole

Proteina	***Tipo***	***Funzione***
MCAM/MUC18	Molecola di adesione	Invasione e metastasi
L1-CAM	Molecola di adesione	Invasione e metastasi
CEA-CAM1	Molecola di adesione	Invasione e metastasi
Osteopontina	Matrice cellulare	Invasione e metastasi
Tenascina-C	Matrice cellulare	Invasione e metastasi
MMP2	Metallo proteinasi	Invasione e metastasi
tPA	Proteinasi	Invasione e metastasi
ki-67	Proteina nucleare	Proliferazione cellulare
Metallotioneina	Enzima intracellulare	Regolazione del ciclo cellulare
Ciclina-E	Proteina del ciclo cellulare	Regolazione del ciclo cellulare
P16/INK4	Inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti	Proliferazione cellulare
Microtubule associated protein-2	Proteina del citoscheletro	Regolazione del ciclo cellulare
P27/KIP1	Enzima intracellulare	Regolazione del ciclo cellulare
CXCR4	Chemochina	Invasione e metastasi
ATF-2	Proteina "DNA-binding"	Attivatore trascrizionale
AP-2alfa	Proteina "DNA-binding"	Attivatore trascrizionale
NCOA3/AIB1	Coattivatore steroideo	Coattivatore trascrizionale
c-KIT	Recettore ad attività tirosina-chinasica	Proliferazione e differenzizione cellulare

In termini di capacità funzionali, nel melanoma sono le proteine che facilitano l'invasione e la metastatizzazione quelle che si candidano come validi marcatori di progressione. In particolare, l'aumentata espressione IHC di tre molecole di adesione, quali MCAM/MUC18, L1-CAM e CEACAM-1 è correlata ad un intervallo libero da malattia significativamente più breve. L'espressione di MCAM/MUC18 è associata anche alla sopravvivenza globale (18). L'iperespressione di L1-CAM e CEACAM-1 è evidente soprattutto al margine profondo della neoplasia e CEACAM-1 e MCAM/MUC18 interagiscono con l'integrina β3 (19), indicando che le alterazioni di tali molecole contribuiscono ad anomale interazioni tumore-stroma.
Un altro importante gruppo di molecole, coinvolte nella progressione del melanoma, è rappresentato dalle proteine della matrice cellulare. Tra queste le più significative sono l'osteopontina (20) e la tenascina-C, proteine che regolano l'espressione e l'attività delle metallo proteinasi (MMP). Fra le proteinasi, due sono le molecole che, se alterate, sono significativamente correlate alla progressione, l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) e MMP-2 (21). Nell'ambito delle proteine legate alla proliferazione cellulare, le più interessanti dal punto di vista prognostico sono il Ki-67, la metallotioneina, il Ku70, il Ku80 e la proteina-2 associata ai microtubuli (22). Tra le cicline, solo la ciclina E sembra avere un valore prognostico nel melanoma, anche se questo risultato scaturisce da studi condotti su un limitato numero di pazienti (22).
Di converso, elevati livelli di p16/INK4A hanno un effetto regolatorio sulla proliferazione di cellule melanomatose (23). Paradossalmente, un'aumentata espressione di p27/KIP1 è stata osservata in pazienti a prognosi infausta. Tale dato, tuttavia, supporta l'ipotesi che la deregolazione di p27/KIP1 avviene mediante accumulo citoplasmatico più che tramite degradazione proteica (24).
I recettori per le chemochine, da CXCR1 a CCR10, sono stati ampiamente studiati nel melanoma. Tuttavia, dati statisticamente rigorosi sono correlati solo all'iperespressione di CXCR4, proteina che appare associata ad un andamento clinico più sfavorevole (25).
Nell'ambito delle molecole legate alla trasduzione del segnale, sono state evidenziate correlazioni positive tra l'espressione di fattori di trascrizione (ATF-2 e AP-2α) e di coattivatori trascrizionali (NCOA3/AIB-1) e la sopravvivenza melanoma specifica, suggerendo che un'alterata attività trascrizionale svolga un ruolo chiave in tale contesto. Anche i recettori per fattori di crescita, le molecole che

ne regolano l'attività trasduzionale (c-KIT, c-Met, EGFR, FGFR, Trk-C, Akt, PTEN, p38 MAP-k, p42 p-ERK) e l'angiogenesi sono stati ampiamente studiati nel melanoma, tuttavia i risultati ottenuti sono stati deludenti (22,26).

Diagnostica molecolare
Nell'attuale era "post-genomica", la disponibilità di tecnologie innovative, quali piattaforme di cDNA o micro-RNA, sistemi biologici ed approcci metodologici *genome-wide*, hanno reso possibile uno studio genico dei tumori umani, incluso il melanoma, particolarmente esaustivo e ha permesso di identificare numerose alterazioni molecolari di tipo somatico, da mutazioni ad amplificazioni geniche, da iperespressione o regolazione negativa di micro-RNA a modificazioni epigenetiche, che possono avere ripercussioni importanti sull'andamento clinico della malattia (27).
In questi ultimi anni, sono stati pubblicati più di 100 studi molecolari nel melanoma, che si sono avvalsi di piattaforme di *microarray*. Questo enorme sforzo tecnologico e metodologico ha portato all'identificazione di più di 100 prodotti genici differenzialmente espressi in melanoma a diversa aggressività clinica (28).
Nonostante tale approccio metodologico appaia incoraggiante, sia per l'identificazione di singoli marcatori prognostici sia per la definizione di combinazioni di marcatori biomolecolari ad elevata potenza statistica, tuttavia non sembra che i risultati emersi da questa ampia analisi molecolare possano condurre in tempi brevi ad un'applicazione nella pratica clinica.

9.3 Marcatori sierici

L'ultimo aggiornamento dell'AJCC *Melanoma Staging Database* ha dimostrato che un'elevata concentrazione sierica dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH) rappresenta un fattore prognostico indipendente ed altamente significativo di sopravvivenza globale in pazienti affetti da melanoma allo stadio IV. Pertanto, pazienti con melanoma metastatico nella cute, nella sottocute, nei linfonodi e/o nel polmone con LDH sierico normale sono rispettivamente classificati come M1a e M1b e hanno una prognosi intermedia. La peggior prognosi è stata osservata per i pazienti metastatici con elevato LDH serico (M1c) (2). LDH è un marcatore di particolare

utilità negli stadi avanzati della neoplasia, soprattutto in combinazione con S100B e MIA (*Melanoma-Inhibiting Activity*) (29).
L'S100B è un biomarcatore di particolare rilevanza clinica nel melanoma. A livello tissutale, è stato descritto per la prima volta nel 1980 (30) e solo nel 1995 è stato pubblicato il primo studio sul suo significato come biomarcatore sierico (31), in cui si evidenziava un'associazione statisticamente significativa tra aumento sierico del biomarcatore e progressione della malattia. Linee Guida Svizzere e Tedesche (32,33) raccomandano la determinazione di S100B nel siero di pazienti con Breslow > 1 mm, ogni 3-6 mesi.

9.4 Fattori predittivi di risposta a terapia

Il melanoma è un tumore difficile da trattare e questa difficoltà riflette da un lato la natura particolarmente "mobile" dei melanociti, dall'altro le conoscenze non ancora del tutto approfondite dei meccanismi molecolari che governano il controllo della crescita dei melanociti normali e trasformati. Una migliore e più dettagliata conoscenza dei meccanismi molecolari che sottendono la progressione del melanoma consentirà la messa a punto di farmaci molecolari sempre più efficaci (34). In tale contesto, è sempre più urgente la necessità di disporre di marcatori predittivi di risposta a terapia.
I risultati da studi di fase III hanno puntualizzato la potenziale associazione tra presenza di ulcerazione e risposta a polietilenglicole (PEG) ed Interferone ricombinante alfa-2a (PEG-IFN) (35), elevato LDH sierico e risposta ad Oblimersen, un oligonucleotide antisenso diretto contro BCL-2 (36), presenza di autoanticorpi e risposta ad alte dosi di IFN (37).
Recenti studi clinici stanno valutando farmaci biologici diretti verso molecole coinvolte nella trasduzione del segnale. Due sono le principali vie di trasduzione del segnale (vedi sottocap. 11.4): a) la via di RAS-RAF-MEK-ERK, coinvolta principalmente in processi proliferativi, b) la via di PI3K-PTEN-AKT, coinvolta principalmente in processi di sopravvivenza cellulare.
Nel 90% dei melanomi si osserva un'iper-attivazione della proteina ERK, mentre il gene BRAF è mutato in circa il 40-50% dei casi. BRAF è in grado di determinare uno stimolo persistente di ERK, con conseguente incremento della proliferazione cellulare e dell'angiogenesi indotta dalla produzione autocrina di VEFG. Un recente studio

clinico (38) ha dimostrato che la mutazione somatica V600E nel gene BRAF induce una risposta completa o parziale in pazienti con melanoma metastatico trattati con farmaci inibitori dell'attività tirosina-chinasica di BRAF o di MEK.
In conclusione, nonostante numerosi siano i biomarcatori prognostici studiati con promettenti rapide ricadute cliniche, tuttavia, al momento, nessuno di questi, come estesamente descritto in questo capitolo, è stato ancora validato in studi clinici randomizzati su larga scala.
Ancor più importante è la necessità di identificare biomarcatori prognostici in grado di guidare la gestione del paziente affetto da melanoma in modo ottimale, per consentire una pianificazione mirata e sempre più personalizzata della terapia.

BIBLIOGRAFIA

1. Gutman S, Kessler LG. The US Food and Drug Administration perspective on cancer biomarker development. *Nat Rev Cancer 2006 Jul; 6(7):565-71*
2. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol 2009 Dec 20; 27(36):6199-206*
3. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg 1970; 172:902-8*
4. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Elashoff R, Essner R, Nieweg OE, Roses DF, Hoekstra HJ, Karakousis CP, Reintgen DS, Coventry BJ, Glass EC, Wang HJ; MSLT Group. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med 2006 Sep 28; 355(13):1307-17. Erratum in: N Engl J Med. 2006 Nov 2; 355(18):1944*
5. Gimotty PA, Van Belle P, Elder DE, Murry T, Montone KT, Xu X, Hotz S, Raines S, Ming ME, Wahl P, Guerry D. Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. *J Clin Oncol 2005 Nov 1; 23(31):8048-56*
6. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg. 1992 Apr; 127(4):392-9*

7. Cook MG, Green MA, Anderson B, Eggermont AM, Ruiter DJ, Spatz A et al. The development of optimal pathological assessment of sentinel lymph nodes for melanoma. *J Pathol 2003; 200:314-9*
8. van Akkooi AC, Spatz A, Eggermont AM, Mihm M, Cook MG. Expert opinion in melanoma: the sentinel node; EORTC Melanoma Group recommendations on practical methodology of themeasurement of the microanatomic location of metastases and metastatic tumour burden. *Eur J Cancer 2009; 45:2736-42*
9. Starz H, Siedlecki K, Balda BR. Sentinel lymphonodectomy and s-classification: a successful strategy for better prediction and improvement of outcome of melanoma. *Ann Surg Oncol 2004; 11(3 Suppl):162S-8S*
10. van Akkooi AC, de Wilt JH, Verhoef C, Graveland WJ, van Geel AN, Kliffen M, Eggermont AM. High positive sentinel node identification rate by EORTC melanoma group protocol. Prognostic indicators of metastatic patterns after sentinel node biopsy in melanoma. *Eur J Cancer 2006 Feb; 42(3):372-80*
11. van der Ploeg AP, van Akkooi AC, Rutkowski P, Nowecki ZI, Michej W, Mitra A, Newton-Bishop JA, Cook M, van der Ploeg IM, Nieweg OE, van den Hout MF, van Leeuwen PA, Voit CA, Cataldo F, Testori A, Robert C, Hoekstra HJ, Verhoef C, Spatz A, Eggermont AM. Prognosis in patients with sentinel node-positive melanoma is accurately defined by the combined Rotterdam tumor load and Dewar topography criteria. *J Clin Oncol 2011 Jun 1; 29(16):2206-14*
12. van Akkooi AC, Nowecki ZI, Voit C, Schäfer-Hesterberg G, Michej W, de Wilt JH, Rutkowski P, Verhoef C, Eggermont AM. Sentinel node tumor burden according to the Rotterdam criteria is the most important prognostic factor for survival in melanoma patients: a multicenter study in 388 patients with positive sentinel nodes. *Ann Surg 2008 Dec; 248(6):949-55*
13. van Akkooi AC, de Wilt JH, Verhoef C, Schmitz PI, van Geel AN, Eggermont AM, Kliffen M. Clinical relevance of melanoma micrometastases (<0.1 mm) in sentinel nodes: are these nodes to be considered negative? *Ann Oncol 2006 Oct; 17(10):1578-85. Epub 2006 Sep 12*
14. Dewar DJ, Newell B, Green MA, Topping AP, Powell BW, Cook MG. The microanatomic location of metastatic melanoma in sentinel lymph nodes predicts nonsentinel lymph node involvement. *J Clin Oncol 2004 Aug 15; 22(16):3345-9*
15. Burton AL, Roach BA, Mays MP, Chen AF, Ginter BA, Vierling AM, Scoggins CR, Martin RC, Stromberg AJ, Hagendoorn L, McMasters KM. Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in melanoma. *Am Surg 2011 Feb; 77(2):188-92*

16. Larson AR, Konat E, Alani RM. Melanoma biomarkers: current status and vision for the future. *Nature Clin Practice Oncol 2009 Feb; 6(2):105-17*
17. Gould Rothberg BE, Bracken MB, Rimm DL. Tissue biomarkers in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst 2009 Apr 1; 101(7) 452-74*
18. Pearl RA, Pacifico MD, Richman PI, Wilson GD, Grover R. Stratification of patients by melanoma cell adhesion molecule (MCAM) expression on the basis of risk: implications for sentinel lymph node biopsy. *J Plast Reconstr Aesthet Surg 2008; 61(3):265-71. Epub 2007 Jun 13*
19. Watson-Hurst K, Becker D. The role of N-cadherin, MCAM and beta3 integrin in melanoma progression, proliferation, migration and invasion. *Cancer Biol Ther 2006; 5(10):1375-82*
20. Rangel J, Nosrati M, Torabian S, Shaikh L, Leong SP, Haqq C, Miller JR 3rd, Sagebiel RW, Kashani-Sabet M. Osteopontin as a molecular prognostic marker for melanoma. *Cancer 2008 Jan 1; 112(1):144-50*
21. Väisänen AH, Kallioinen M, Turpeenniemi-Hujanen T. Comparison of the prognostic value of matrix metalloproteinases 2 and 9 in cutaneous melanoma. *Hum Pathol 2008 Mar; 39(3):377-85. Epub 2008 Jan 9*
22. Alonso SR, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gómez B, Sánchez L, Acuña MJ, Pajares R, Martínez-Tello FJ, Hortelano CM, Piris MA, Rodríguez-Peralto JL. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol 2004 Jan; 164(1):193-203*
23. Sharpless NE, Kannan K, Xu J, Bosenberg MW, Chin L. Both products of the mouse Ink4a/Arf locus suppress melanoma formation in vivo. *Oncogene 2003 Aug 7; 22(32):5055-9*
24. Denicourt C, Saenz CC, Datnow B, Cui XS, Dowdy SF. Relocalized p27Kip1 tumor suppressor functions as a cytoplasmic metastatic oncogene in melanoma. *Cancer Res 2007 Oct 1; 67(19):9238-43*
25. Scala S, Ottaiano A, Ascierto PA, Cavalli M, Simeone E, Giuliano P, Napolitano M, Franco R, Botti G, Castello G. Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res 2005 Mar 1; 11(5):1835-41*
26. Pisacane AM, Risio M. VEGF and VEGFR-2 immunohistochemistry in human melanocytic naevi and cutaneous melanomas. *Melanoma Res 2005 Feb; 15(1):39-43*
27. Dadras SS. Molecular diagnostics in melanoma: current status and perspectives. *Arch Pathol Lab Med 2011 Jul; 135(7):860-9*
28. Gould Rothberg BE, Rimm DL. Biomarkers: the useful and the not so useful-an assessment of molecular prognostic markers for cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol 2010 Aug; 130(8):1971-87. Epub 2010 Jun 17*

29. Deichmann M, Benner A, Bock M, Jäckel A, Uhl K, Waldmann V, Näher H. S100-Beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer stage IV melanoma. *J Clin Oncol 1999 Jun; 17(6):1891-6*
30. Gaynor R, Irie R, Morton D, Herschman HR. S100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature 1980 Jul 24; 286(5771):400*-1
31. Guo HB, Stoffel-Wagner B, Bierwirth T, Mezger J, Klingmüller D. Clinical significance of serum S100 in metastatic malignant melanoma. *Eur J Cancer 1995 Oct; 31A(11):1898-902*
32. Dummer R, Panizzon R, Bloch PH, Burg G; Task Force Skin Cancer. Updated Swiss guidelines for the treatment and follow-up of cutaneous melanoma. *Dermatology 2005; 210(1):39-44*
33. Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M, Schadendorf D, Stolz W, Reinhold U, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R. Evidence and interdisciplinary consense-based German guidelines: diagnosis and surveillance of melanoma. *Melanoma Res. 2007 Dec;17(6):393-9*
34. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature 2007 Feb 22; 445(7130):851-7*
35. Eggermont AM, Suciu S, Santinami M, Testori A, Kruit WH, Marsden J, Punt CJ, Salès F, Gore M, Mackie R, Kusic Z, Dummer R, Hauschild A, Musat E, Spatz A, Keilholz U; EORTC Melanoma Group. Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *Lancet 2008 Jul 12; 372(9633):117-26*
36. Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U, Pavlick AC, DeConti R, Hersh EM, Hersey P, Kirkwood JM, Haluska FG; Oblimersen Melanoma Study Group. J Clin Oncol. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol 2006 Oct 10; 24(29):4738-45. Epub 2006 Sep 11*
37. Gogas H, Ioannovich J, Dafni U, Stavropoulou-Giokas C, Frangia K, Tsoutsos D, Panagiotou P, Polyzos A, Papadopoulos O, Stratigos A, Markopoulos C, Bafaloukos D, Pectasides D, Fountzilas G, Kirkwood JM. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N Engl J Med 2006 Feb 16; 354(7):709-18*
38. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med 2010 Aug 26; 363(9):809-19*

10.0 TRATTAMENTO CHIRURGICO E LOCO-REGIONALE

10.1 Biopsia e trattamento del primitivo
10.2 Linfonodi
10.3 Metastasi in transito
10.4 Metastasi a distanza

10.1 Biopsia e trattamento del primitivo

Di fronte ad una lesione, in cui si ponga la diagnosi clinica di sospetto di melanoma, è indicato effettuare la biopsia escissionale, cioè l'asportazione completa della lesione con circa 2 mm di cute sana circostante e del grasso sottocutaneo, al fine di poter effettuare un'accurata diagnosi istopatologica con valutazione di tutti i parametri prognostici necessari a pianificare la successiva strategia terapeutica (1-4).
La biopsia incisionale non dovrebbe essere effettuata quando una biopsia escissionale è tecnicamente possibile. La biopsia incisionale può trovare indicazione in sedi particolari quali la sub-ungueale, le grandi lesioni pigmentate del volto, le lesioni delle mucose e quando l'exeresi completa comporti demolizioni non giustificabili in caso di lesione benigna. Biopsie *shave*, laser, diatermocoagulazioni non dovrebbero essere effettuate, in quanto non permettono uno *staging* patologico accurato (1-4).
Dopo la biopsia escissionale, il trattamento chirurgico del melanoma primitivo localmente si completa con l'ampliamento dell'escissione, in base allo spessore istologico della lesione. Cinque studi randomizzati sono stati effettuati per confrontare diverse ampiezze di asportazione del melanoma primario (5).
Nel 1988, è stato pubblicato il primo studio randomizzato dalla *World Health Organization* (WHO), che confrontava melanomi di spessore ≤ 2 mm, che venivano asportati a 1 o 3 cm dai margini (5-8). Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative nell'intervallo libero e nella sopravvivenza tra i due gruppi in studio. Altri 2 studi randomizzati hanno confrontato melanomi di spessore ≤ 2 mm asportati a 2 o 5 cm dai margini, non evidenziando differenze significative nel numero di recidive locali e sopravvivenza tra i due gruppi (5-8).

L'*Intergroup Melanoma Trial* ha confrontato melanomi di spessore 1-4 mm asportati a 2 o 4 cm dai margini. Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra i due gruppi in studio relativamente a recidive locali, intervallo libero e sopravvivenza (5-8).
Infine, uno studio prospettico randomizzato effettuato in Gran Bretagna ha confrontato melanomi di spessore > 2 mm asportati a 1 o 3 cm dai margini (5-7). Al gruppo di pazienti con melanoma asportato a 1 cm dai margini si associava un numero significativamente maggiore di recidive locali e di progressione regionale della malattia, mentre non vi erano differenze significative nella sopravvivenza.
Pertanto, i risultati che emergono dagli studi randomizzati non permettono di individuare con certezza margini di escissione ottimali per tutti i melanomi. In particolare, non abbiamo indicazioni chiare relativamente all'ampiezza ottimale di escissione di melanomi di spessore compreso tra 1 e 2 mm e per spessori > 4 mm, in quanto i diversi studi randomizzati confrontano melanomi di spessori diversi ed utilizzano diversi margini di escissione.
Sono state effettuate 5 meta-analisi degli studi randomizzati, in considerazione della possibilità che singoli studi possano avere un potere statistico non sufficiente per evidenziare differenze di sopravvivenza più piccole di quelle previste dal disegno dello studio, ma rilevanti dal punto di vista clinico. Nessuna di tali meta-analisi ha evidenziato differenze di sopravvivenza globale OS (*Overall Survival*) tra escissioni "ampie" (3-5 cm) rispetto ad escissioni "strette" (1-2 cm) (5-8).
Tuttavia, l'ultima di tali meta-analisi (8) evidenzia limiti metodologici e di comparazione tra gli studi precedenti. In particolare, il confronto tra escissioni a margini stretti ed escissioni a margini ampi in tale studio evidenzia: un rischio aumentato di recidive loco-regionali LDFS (*Locoregional Disease-Free Survival*); una differenza *borderline* nell'intervallo libero DFS (*Disease Free Survival*), che diviene significativa se si analizzano separatamente i 2 studi randomizzati effettuati sui melanomi spessi (> 2 mm); un rischio aumentato nella mortalità specifica per malattia DSS (*Disesase Specific Survival*) nei 3 studi che riportano tale dato; differenze non significative nella OS.
In definitiva, sulla base dei dati disponibili e di consenso tra *panel* di esperti, attualmente sono ritenute appropriate asportazioni con i seguenti margini di ampiezza dal melanoma primitivo (Tabella 1) (1-4,9,10): 0,5 cm dai margini per melanomi *in situ* (particolare attenzione deve essere rivolta ai casi di *lentigo maligna* di ampie dimensioni a limiti sfumati, ove si possono rendere necessarie

asportazioni più ampie e/o tecniche di valutazione intra-operatoria dei margini per raggiungere un'exeresi completa); 1 cm dai margini per melanomi di spessore fino a 2 mm; 2 cm dai margini per melanomi di spessore compreso tra 2,01 e 4 mm; almeno 2 cm dai margini per melanomi di spessore > 4 mm.

Tabella 1 Margini di asportazione chirurgica del melanoma

Spessore del melanoma	*Margini di escissione*
In situ	0,5 cm
≤ 2 mm	1 cm
2,01-4 mm	2 cm
> 4 mm	2 cm

E' indicato estendere l'exeresi fino alla fascia muscolare, che viene generalmente conservata, in quanto non vi sono differenze in termini di recidive locali o a distanza tra la rimozione o conservazione della stessa (4,10).
L'ampiezza di escissione può essere ridotta in sedi particolari di insorgenza del melanoma, dove un'exeresi allargata comporterebbe esiti invalidanti dal punto vista estetico e funzionale. L'asportazione di melanomi del letto ungueale o della porzione distale delle dita delle mani o dei piedi, frequentemente necessita la disarticolazione della falange distale o metacarpo-falangea (4,10).

BIBLIOGRAFIA

1. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, Grob JJ, Malvehy J, Newton-Bishop J, Stratigios A, Pehamberger H, Eggermont A. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer 2010; 46:270-83*

2. Wright F, Spithoff K, Easson A, Murray C, Toye J, McCready D, Petrella T; the Melanoma Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based Care. Primary excision margins and sentinel lymph node biopsy in clinically node-negative melanoma of the trunk or extremities. *Clin Oncol (R Coll Radiol) 2011 May 21; Epub ahead of print*
3. Marsden JR, Newton-Bishop JA, Burrows L, Cook M, Corrie PG, Cox NH, Gore ME, Lorigan P, MacKie R, Nathan P, Peach H, Powell B, Walker C. Revised UK guidelines for the management of cutaneous melanoma 2010. *J Plast Reconstr Aesth Surg 2010; 63:1401-19*
4. Testori A, Rutkowski P, Marsden J, Bastholt L, Chiaron-Sileni V, Hauschild A, Eggermont AMM. Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. *Ann Oncol 2009; 20s6:vi22-9*
5. Mocellin S, Pasquali S, Nitti D. The impact of surgery on survival of patients with cutaneous melanoma: revisiting the role of primary tumor excision margins. *Ann Surg 2011; 353:238-43*
6. Sladden MJ, Balch C, Barzilai DA, Berg D, Freiman A, Handiside T, Hollis S, Lens MB, Thompson JF. Surgical excision margins for primary cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst Rev 2009 Oct 7; (4):CD004835. Review*
7. Lens MB, Nathlan P, Bataille V. Excision margins for primary cutaneous melanoma: updated pooled analysis of randomized controlled trials. *Arch Surg 2007; 142:885-91*
8. Haigh PI, DiFronzo LA, McCready DR. Optimal excision margins for primary cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Can J Surg 2003; 46:419-26*
9. National Comprehensive Cancer Network clinical practice guidelines in oncology: melanoma v4.2011. Available at: *http://www.nccn.org/*
10. Blazer DG, Sondak VK, Sabel MS. Surgical therapy of cutaneous melanoma. *Sem Oncol 2007; 34:270-80*

10.2 Linfonodi

La chirurgia rappresenta ad oggi il trattamento *standard* per le metastasi linfonodali da melanoma (1). Gli studi randomizzati, condotti nei decenni precedenti, che hanno confrontato la linfoadenectomia elettiva, eseguita nei pazienti con linfonodi clinicamente negativi, e la linfoadenectomia terapeutica (LT), eseguita in caso di sviluppo di metastasi linfonodali clinicamente evidenti, hanno dimostrato la sostanziale equivalenza di questi due approcci (2).

Biopsia del linfonodo sentinella (BLS)

In questo contesto, la BLS, messa a punto all'inizio degli anni '90 da Morton e Cochran, ha modificato in maniera sostanziale l'approccio ai pazienti con melanoma cutaneo e linfonodi clinicamente negativi. La valutazione del linfonodo sentinella (LS), il primo linfonodo drenante la cute interessata dal melanoma, ha permesso di predire con elevata accuratezza (> 95%) lo stato dei linfonodi regionali, selezionando così per la linfoadenectomia di completamento (LC) solo i pazienti con metastasi linfonodali (circa il 15-20%) (3).

L'MSLT-1 è uno studio randomizzato disegnato per valutare l'impatto della BLS sulla prognosi dei pazienti con melanoma (4). Sono stati randomizzati 1.347 pazienti con melanoma a spessore intermedio (1,2-3,5 mm) e 647 con spessore di Breslow < 1,2 mm o > 3,5 mm, a ricevere BLS ed escissione ampia o la sola escissione ampia. Nella terza analisi intermedia dei dati dello studio è stato dimostrato come la BLS non impatti la prognosi dei pazienti con melanoma a spessore intermedio (sopravvivenza a 5 anni dell'87,1% e dell'86,6% nei due gruppi, p=0,58).

Tuttavia, la BLS migliora l'intervallo libero da malattia, che a 5 anni è del 78% nei pazienti trattati verso il 73% nel gruppo sottoposto ad osservazione, p=0,009.

Lo studio ha inoltre confermato l'elevato valore prognostico del LS: sopravvivenza a 5 anni del 72% e del 90% per i pazienti con linfonodo sentinella positivo e negativo, rispettivamente. Infine, il sottogruppo di pazienti con metastasi linfonodali, che era stato sottoposto a linfoadenectomia immediata dopo LS positivo, ha avuto una prognosi migliore rispetto a quella del sottogruppo di pazienti sottoposto a LT per linfonodi clinicamente patologici (72% vs 52%; p=0,004).

Questa tendenza è stata confermata da una meta-analisi, che ha raggruppato altri 6 studi non randomizzati a questo gruppo di pazienti (5).
Numerosi studi hanno confermato come i più importanti fattori predittivi dello stato linfonodale nei pazienti con melanoma siano lo spessore secondo Breslow, l'ulcerazione, l'indice mitotico e l'età del paziente.
Alla luce di questi risultati, la BLS è oggi indicata nei pazienti con melanoma a spessore intermedio (1,0-4,0 mm) ed elevato (> 4,0 mm), dove l'incidenza di metastasi linfonodali si osserva nel 10-20% ed in oltre il 30-40% dei casi, rispettivamente. Nei pazienti con melanoma sottile (spessore < 1 mm), l'indicazione alla BLS va discussa con il paziente in presenza di fattori clinico-patologici avversi, quali la presenza di ulcerazione ed indice mitotico ≥ 1 mm^2 (1).

Linfoadenectomia di completamento
Solo il 15-20% dei pazienti con LS positivo presenta ulteriori linfonodi metastatici alla LC. Inoltre, pazienti con basso carico di malattia al LS, sub-micromestasi di diametro massimo < 0,1mm, sembrano avere un rischio molto basso di sviluppare metastasi ai linfonodi non sentinella (6).
Queste osservazioni, unite alla mancanza di evidenza riguardo all'impatto della linfoadenectomia sulla prognosi dei pazienti, hanno portato al disegno di due studi prospettici, l'MSLT-2 ed il MINITUB. L'MSLT-2 è uno studio internazionale multicentrico che randomizza i pazienti con LS positivo ad essere trattati con LC o ad essere seguiti con ecografia linfonodale ogni 4 mesi. Il MINITUB è uno studio osservazionale promosso dall'*European Organisation for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) che prevede di evitare la LC nei pazienti con metastasi del LS localizzate in sede sottocapsulare e di diametro $\leq$ 0,4 mm. I risultati provenienti da questi due rilevanti studi forniranno maggiore evidenza sul valore della LC nei pazienti con LS positivo, che a tutt'oggi resta comunque indicata anche in presenza di micrometastasi.

Linfoadenectomia terapeutica
La LT è indicata nel caso di metastasi dei linfonodi regionali clinicamente evidenti all'esame obiettivo od alla valutazione strumentale, con ecografia e/o TC, confermate da prelievo citologico o bioptico (1).

La LT prevede la dissezione completa dei bacini linfonodali in presenza di: 1) metastasi ai linfonodi ascellari, lo svuotamento dei tre livelli linfonodali con asportazione del muscolo piccolo pettorale; 2) metastasi ai linfonodi laterocervicali, l'asportazione dei 5 livelli, con parotidectomia superficiale, in caso di positività dei linfonodi intraparotidei o di melanoma primitivo localizzato all'emivolto omolaterale; 3) metastasi ai linfonodi dell'inguine, lo svuotamento dei 3 livelli e cioè inguinale, iliaco ed otturatorio.
Sembra che la completezza della linfoadenectomia abbia un impatto sulla prognosi dei pazienti. Infatti, l'N-*ratio*, ovvero il rapporto tra linfonodi positivi ed asportati dopo linfoadenectomia (valore compreso tra 0 e 1), è un parametro prognostico indipendente nei pazienti con metastasi linfonodali (7,8). Pazienti con N-*ratio* basso (≤ 0,1 o 0,11-0,25) hanno una sopravvivenza globale superiore a coloro che hanno un valore elevato di N-*ratio* (> 0,25). A parità di carico di malattia linfonodale, tanto più completa è la linfoadenectomia (ovvero, quanti più sono i linfonodi asportati), tanto più basso è l'N-*ratio* e, dunque, l'appartenenza del paziente ad una classe di rischio inferiore.
Tuttavia, la linfoadenectomia è caratterizzata da una significativa morbidità. Le complicanze post-operatorie più frequenti sono l'infezione di ferita, la deiscenza, l'ematoma, il linfocele, il linfedema a breve e lunga distanza dall'intervento ed il danno nervoso. Lo svuotamento dell'inguine rappresenta l'intervento a più alto rischio di complicanze (incidenza fino all'80%). L'età, il *Body Mass Index* (BMI), la presenza di malattia clinicamente evidente e comorbidità, quali il diabete, rappresentano i fattori di rischio principali per lo sviluppo di complicanze (9). Lesioni a strutture nervose si osservano più frequentemente nel corso di svuotamenti del collo, particolarmente quando vi è un interessamento della parotide.
Queste evidenze hanno portato a considerare la riduzione dell'ampiezza della dissezione linfonodale, in particolare nei pazienti con LS positivo delle regioni latero-cervicali ed inguinale, come dimostrano i dati provenienti da una recente rassegna internazionale sull'opinione del chirurgo riguardo alla linfoadenectomia di completamento nei pazienti con LS positivo (dati non pubblicati).
Per quanto riguarda la LC del collo in presenza di LS positivo, l'estensione della linfoadenectomia è valutata principalmente sulla base della sede del tumore primitivo e del drenaggio linfatico evidenziato alla linfoscintigrafia. Similmente, la parotidectomia superficiale è generalmente riservata ai casi in cui vi sia un sicuro

coinvolgimento dei linfonodi intraparotidei od in presenza di LS positivo del collo, quando il drenaggio linfatico coinvolga la parotide.
In caso di LS positivo all'inguine, sono utilizzati tre approcci: il solo svuotamento della regione inguinale, lo svuotamento inguino-iliaco-otturatorio, lo svuotamento iliaco-otturatorio se dopo la linfoadenectomia inguinale vi sono almeno 3 linfonodi positivi, e/o il linfonodo di Cloquet positivo e/o presenza di drenaggio linfatico ai linfonodi pelvici evidente alla linfoscintigrafia.
Inoltre, nel tentativo di ridurre la morbilità da linfoadectomia della regione inguinale, alcuni Autori hanno recentemente proposto interventi a minor invasività, come lo svuotamento inguinale video-assistito (9).

Controllo di qualità
Ad oggi, non vi sono parametri condivisi per monitorare la qualità della linfoadenectomia, tanto che le Linee Guida della *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) richiedono solamente la descrizione accurata delle aree anatomiche sottoposte a dissezione.
Il numero di linfonodi asportati è stato proposto da alcuni Autori come criterio per valutare la qualità di queste procedure. Tuttavia, non è stato ancora raggiunto un consenso su quale debba essere il numero minimo di linfonodi da asportare per ciascuna stazione linfonodale, dal momento che alcuni valori minimi sono stati suggeriti sulla base di opinione di esperti e pochi studi si basano sull'evidenza clinica. A questo proposito, sono stati suggeriti due diversi approcci. Ricercatori del *Melanoma Institute of Australia* propongono di usare il 90° percentile del numero di linfonodi asportati per ciascun bacino linfonodale come parametro per identificare gli svuotamenti incompleti e, quindi, di bassa qualità (10). Ricercatori del *MD Anderson* hanno calcolato quale debba essere il numero minimo di linfonodi per ciascun bacino basandosi sull'impatto prognostico dell'N-*ratio* (11).
In assenza di evidenze sufficienti per dimostrare che il numero di linfonodi asportati impatti sulla prognosi dei pazienti, può essere utile disegnare oggi studi che confermino sia il valore dell'N-*ratio* sia quello del numero minimo di linfonodi escissi come parametri per il controllo di qualità delle linfoadenectomie.

BIBLIOGRAFIA

1. Australian Cancer Network Melanoma Guidelines Revision Working Party. Clinical Practice Guidelines for the Management of Melanoma in Australia and New Zealand. Cancer Council Australia and Australian Cancer Network, Sydney and New Zealand Guidelines Group, *Wellington 2008*
2. Lens MB, Dawes M, Goodacre T, Newton-Bishop JA. Elective lymph node dissection in patients with melanoma: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Archives of surgery 2002; 137:458-61*
3. Gershenwald JE, Ross MI. Sentinel-lymph-node biopsy for cutaneous melanoma. *N Engl J Med 2011; 364:1738-45*
4. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ et al. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med 2006; 355:1307-17*
5. Pasquali S, Mocellin S, Campana LG et al. Early (sentinel lymph node biopsy-guided) versus delayed lymphadenectomy in melanoma patients with lymph node metastases: personal experience and literature meta-analysis. *Cancer 2010; 116:1201-09*
6. Murali R, Desilva C, Thompson JF, Scolyer RA. Non-Sentinel Node Risk Score (N-SNORE): a scoring system for accurately stratifying risk of non-sentinel node positivity in patients with cutaneous melanoma with positive sentinel lymph nodes. *J Clin Oncol 2010; 28:4441-49*
7. Rossi CR, Mocellin S, Pasquali S et al. N-ratio: a novel independent prognostic factor for patients with stage-III cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol 2008; 15:310-5*
8. Spillane AJ, Cheung BL, Winstanley J, Thompson JF. Lymph node ratio provides prognostic information in addition to american joint committee on cancer N stage in patients with melanoma, even if quality of surgery is standardized. *Annals of surgery 2011; 253:109-15*
9. Delman KA, Kooby DA, Rizzo M et al. Initial experience with videoscopic inguinal lymphadenectomy. *Annals of surgical oncology 2011; 18:977-82*
10. Spillane AJ, Cheung BL, Stretch JR et al. Proposed quality standards for regional lymph node dissections in patients with melanoma. *Annals of surgery 2009; 249:473-80*
11. Xing Y, Badgwell BD, Ross MI, Gershenwald JE, Lee JE, Mansfield PF, Lucci A, Cormier JN. Lymph node ratio predicts disease-specific survival in melanoma patients. *Cancer 2009; 115:2505-13*

10.3 Metastasi in transito

Le "metastasi in transito" sono metastasi multifocali, che si diffondono attraverso il sistema linfatico e che si localizzano tra la sede della lesione primitiva e la stazione linfatica regionale di drenaggio per quella sede (1).
I pazienti con metastasi in transito sono classificati in stadio IIIB o IIIC, in base alle caratteristiche del tumore primitivo e allo stato dei linfonodi regionali, senza considerare il numero di lesioni (2,3). Il numero di pazienti che sviluppano metastasi in transito non è insignificante; uno studio tedesco, condotto per 30 anni, mostra che il 21% delle recidive sono in forma di metastasi in transito o satelliti (4).
Un altro studio (1) riporta che dal 2% al 10% delle donne con melanoma delle estremità, inizialmente trattate, sviluppano metastasi *in transit*. Storicamente, questi *pattern* di ricorrenza sono associati ad una prognosi sfavorevole, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni del 25-30% (5,6). Il trattamento di metastasi cutanee e sottocutanee di un melanoma avanzato rappresenta una sfida difficile.
Per lesioni singole o localizzate, la chirurgia è il trattamento di scelta.
In caso di lesioni non resecabili, il trattamento di scelta dipende dalle dimensioni, dal numero e dalla localizzazione delle stesse.
Esistono differenti opzioni terapeutiche, come la radioterapia, la chemioterapia sistemica, la polichemioterapia, la perfusione isolata all'arto, l'Interferone alfa o la crioterapia, l'ablazione con laser o radiofrequenza.
Nella minoranza dei pazienti, l'escissione chirurgica delle metastasi in transito può essere effettuata quando vi sono pochi depositi tumorali (7). Sfortunatamente, la maggior parte dei pazienti presenta lesioni multifocali, per le quali un trattamento *standard* di chemioterapia sistemica o di immunoterapia produce benefici limitati (8,9).
In questo capitolo, verrà descritta l'esperienza, riportata in letteratura, nel trattamento delle metastasi *in transit* da melanoma con la chemioterapia regionale, effettuata con la perfusione ipertermico-antiblastica, l'infusione isolata dell'arto e con l'elettrochemioterapia (ECT).

Perfusione isolato dell'arto
Il trattamento regionale per le metastasi in transito da melanoma, in forma di perfusione ipertermica isolata all'arto, è stato messo a punto da Creech et al. (10,11). Questa tecnica è ancora oggi usata e,

nel complesso, è rimasta immutata in tutti i suoi componenti. Creech et al. (10) usavano il Melphalan come agente chemioterapico, basandosi su studi *in vivo* sui topi. L'ipertermia dell'arto è raggiunta grazie al perfusato riscaldato ed alle coperte termiche avvolte intorno all'arto per tutta la durata della procedura.
La maggiore differenza tra la chemioterapia sistemica e quella regionale sta nel portare elevate dosi di chemioterapico attraverso un circuito isolato, minimizzando la dispersione sistemica del farmaco e la risultante tossicità. Poiché il tasso di dispersione è < 1%, quando si esegue la perfusione ipertermico-antiblastica con farmaci convenzionali citotossici, esistono pochi effetti collaterali sistemici e la tossicità d'organo è raramente dose limitante (12). Come risultato, il Melphalan può raggiungere tranquillamente livelli da 10 a 100 volte più elevati nella chemioterapia regionale rispetto a quella sistemica. Inoltre, l'ipertermia potenzia l'efficacia della chemioterapia fino ad ottenere un effetto sinergistico.
La perfusione ipertermico-antiblastica si è dimostrata in grado di ottenere una risposta completa pari al 50%, questo è un fattore prognostico indipendente poiché influenza sia la sopravvivenza libera da malattia sia quella globale (13). Negli anni '90, è stato introdotto nella pratica clinica il TNF (*Tumor Necrosis Factor)*, che si è dimostrato in grado di produrre un incremento della risposta completa (Tabella 1), che mediamente si attesta intorno al 70%. Studi di fase I-II hanno dimostrato che anche dosaggi < 3-4 mg sono in grado di conseguire la stessa percentuale di risposte complete, con il vantaggio di minor effetti sistemici e minor costo (*in vivo*).

Tabella 1 Perfusione isolata dell'arto con alte o basse dosi di TNFα

	TNF	***N. pz.***	***CR (%)***	***PR (%)***	***OR (%)***
TNF-LPAM -INFγ (14-17)	3-4 mg	457	67,8	21,4	91,4
TNF-LPAM (13,18)	1 mg	167	74	25	94,4

CR: risposta completa; PR: risposta parziale; OR: risposta totale

L'esperienza maturata nell'ambito della SITILO (Società Italiana di Terapie Integrate Loco-Regionali in Oncologia) ha dimostrato che la risposta tumorale è influenzata solo dal numero delle lesioni (p=0,02). Il controllo loco-regionale è influenzato dallo stadio di malattia (p=0,04), dal numero delle lesioni (p=0,03) e dall'età del paziente (p=0,03). La sopravvivenza libera da malattia è influenzata dall'età (p=0,008) e dallo stadio (p=0,06). Infine, la sopravvivenza globale è influenzata dallo stadio (p=0,05) e dal numero delle lesioni (p=0,01) (*in vivo*). Infine, dall'analisi dei dati si è potuto evidenziare che l'utilizzo del TNF va riservato solo a pazienti con malattia *bulky* (numero di noduli > 10 e/o presenza di noduli con diametro > 3 cm) (*in vivo*).

Infusione isolata dell'arto

Più recentemente, Thompson et al., presso il *Sidney Melanoma Unit* (13), hanno sviluppato un'alternativa alla perfusione isolata dell'arto definita infusione isolata dell'arto. Questa tecnica è meno invasiva della perfusione, in quanto viene realizzata mediante cateterizzazione percutanea dell'arto affetto da metastasi in transito. Il Melphalan viene introdotto nel circuito extracorporeo e la circolazione ha la durata di circa 30 minuti. Poiché nel circuito extracorporeo non ci sono lo scambiatore di calore e l'ossigenatore, il trattamento viene condotto in normotermia, in ipossia ed in acidosi. Fattori, questi ultimi due, che possono incrementare l'efficacia del Melphalan (19).

L'infusione isolata dell'arto viene generalmente riservata a pazienti "fragili" con multiple comorbidità, che non possono tollerare la perfusione isolata dell'arto. Esistono alcuni potenziali svantaggi dell'infusione isolata dell'arto. Il livello di ipertermia che si raggiunge con la perfusione non è attendibile con l'infusione isolata dell'arto ed è noto che l'ipertermia potenzia notevolmente l'efficacia del Melphalan. Inoltre, nell'infusione isolata dell'arto viene impiegata una dose minore di Melphalan, come pure la durata del trattamento è la metà rispetto a quella della perfusione. Queste differenze possono spiegare una minore percentuale di risposte complete ottenute con questo approccio (Tabella 2). Evidenza, confermata in un recente studio multicentrico (20), che ha dimostrato in una casistica di 313 pazienti un tasso di risposte complete (79%) dopo perfusione superiore a quello (64%) con l'infusione dell'arto.

Tabella 2 Percentuale di risposte ottenute con infusione isolata dell'arto in pazienti affetti da metastasi *in transit* da melanoma

Studi	*N. pz.*	*CR(%)*	*PR(%)*	*SD(%)*	*PD(%)*
Milan et al. *Can J Surg 2001*	9	44	56	0	0
Linder et al. *Ann Surg Oncol 2001*	128	41	44	12	4
Bonenkamp et al. *Eur J Surg Oncol 2004*	13	31	61	0	8
Brady et al. *Ann Surg Oncol 2006*	22	23	27	0	50
Beasley et al. *Ann Surg Oncol 2008*	50	30	14	10	46
Kroon et al. *Ann Surg Oncol 2008*	185	38	46	10	6
Beasly et al. *J Am Coll Surg 2009*	128	31	33	7	29

CR: risposta completa, PR: risposta parziale, SD: patologia stabile, PD: malattia progressiva

Elettrochemioterapia (ECT)

Molti studi clinici recenti hanno proposto l'ECT come una nuova e complementare arma per controllare le metastasi in transito (21-24). Numerosi studi clinici sono in corso sull'associazione di farmaci e terapia genica, entrambi con l'elettroporazione. ECT è basata sull'elettroporazione, sistema che incrementa la penetrazione di farmaci, geni o molecole, all'interno delle cellule tumorali, utilizzando campi elettrici esterni, che incrementano la permeabilità delle membrane cellulari (22-25). Utilizzando brevi ed intensi impulsi elettrici, la membrana plasmatica diventa permeabile ai farmaci non permeanti o scarsamente permeanti, potenziandone la tossicità.

Tra i numerosi farmaci saggiati negli studi preclinici, Bleomicina e Cisplatino sono stati considerati i più adatti per tale trattamento. L'esposizione delle cellule all'impulso elettrico incrementa di 80 volte la tossicità del Cisplatino e di 8000 quella della Bleomicina (26,27). Conseguentemente, la regressione del tumore raggiunta con l'ECT con basse dosi di farmaco ridurrebbe al minimo gli effetti collaterali sistemici.

L'uso dell'ECT ha avuto inizio alla fine degli anni '80 ed è stato dimostrato che questa tecnica è efficace nel trattamento di metastasi cutanee e sottocutanee (28,29). Il primo studio clinico, pubblicato nel 1991, ha dimostrato l'efficacia di questo trattamento nella terapia di noduli recidivi da neoplasia di testa collo. Successivamente, si è dimostrata l'efficacia della tecnica nel trattamento di neoplasie cutanee e sottocutanee di origine da neoplasie mammarie, sarcoma di Kaposi, ipernefroma, condrosarcoma e carcinoma basocellulare (28). Questi studi sono stati condotti sia su tumori primitivi sia sui recidivi, con sessioni singole o multiple, con protocolli di trattamento ed elettrodi differenti (30-35).

Lo studio ESOPE (*European Standard Operating Procedures of Electrochemiotherapy*), condotto su 41 pazienti, non solo ha confermato l'efficacia dell'ECT, ma questa procedura è stata testata in accordo al tipo di tumore, al farmaco impiegato (Bleomicina o Cisplatino), alla via di somministrazione (venosa o intra-tumorale) ed al tipo di elettrodo impiegato. In altre parole, è stata ottenuta una standardizzazione della procedura (28).

Questo studio ha evidenziato una risposta completa nel 73% ed una risposta obiettiva nell'85% dei casi, con un controllo locale della malattia a 5 mesi, in circa l'80% dei noduli.

Da una revisione degli studi pubblicati finora, risulta che la risposta completa oscilla dal 9% al 100%, mentre la risposta obiettiva varia dal 62% al 100% (Tabella 3). Mediamente, la risposta completa è stata del 58% e quella obiettiva dell'86%, entrambe ottenute in 1.351 metastasi trattate. Inoltre, un trattamento effettuato in più sessioni può incrementare la percentuale di risposte complete (19).

Tabella 3 Revisione della letteratura sul trattamento delle metastasi da melanoma con ECT

Autori	*Pazienti trattati*	*Metastasi trattate*	*Via di somministraz. di farmaci citostatici*	*Trattamenti metastasi per paziente*	*%*	
					Risposta obiettiva	*Risposta completa*
Glass, *Arch Dermatol 1996*	5	23	Intra-tumorale	4,6	95	78
Heller, *Cancer 1998*	12	84	Intra-tumorale	7	98	89
Rols, *Melanoma Res 2000*	4	55	Endovenosa	13.7	90	9
Cuevas, *Arch Med Res 2001*	2	13	Intra-tumorale	7,5	84,5	23
Byrne, *Melanoma Res 2005*	19	53	Intra-tumorale	2,7	73	64
Kubota, *Melanoma Res 2005*	1	8	Intra-tumorale	8	100	100
Gaudy, *J Cutan Med Surg 2006*	12	23	Intra-tumorale	1,9	66	37
Marty, *EJC suppl 2006*	20	98	Intra-tumorale ed endovenosa	4,9	81	66
Snoj, *Croat Med 2007*	1	224	Endovenosa	224	100	100
Quaglino, *Ann Surg Oncol 2009*	14	233	Endovenosa	16,6	93	58
Campana, *Ann Surg Oncol 2009*	34	373	Intra-tumorale ed endovenosa	10,9	96	50
Kaelher, *Dermatol Surg 2010*	1	6	Intra-tumorale	6	100	100
Kis, *Dermatol Surg 2011*	9	158	Intravenosa	17,5	62	23
TOTALE	**134**	**1.351**	**Media**	**25**	**87,6**	**61,3**

I fattori prognostici maggiormente correlati alla risposta tumorale sono la dimensione dei noduli (risposte complete inferiori per dimensioni > 3 cm) ed il numero dei noduli (20). Fattori prognostici indipendenti per il controllo locale della malattia e la sopravvivenza sono il numero delle sedute di ECT e lo spessore del melanoma primitivo (20).
In conclusione, la perfusione isolata dell'arto rimane il trattamento di scelta nella terapia delle metastasi *in transit*, in quanto in grado di fornire il più elevato tasso di risposte complete, fattore che è in grado di influenzare sia il controllo loco-regionale sia la sopravvivenza. L'uso del TNF va riservato solo a pazienti con malattia *bulky*.
L'infusione isolata dell'arto è una valida alternativa alla perfusione, specialmente in pazienti fragili con molteplici comorbidità e con localizzazioni della malattia distalmente al III medio di coscia.
L'ECT ha il vantaggio, non trascurabile, che può essere applicata in qualsiasi regione del corpo e può rappresentare una valida alternativa terapeutica in caso di fallimento di altri trattamenti (chirurgia, perfusione ed infusione isolata dell'arto), con un impatto positivo anche sulla qualità di vita.

BIBLIOGRAFIA

1. Pawlik TM, Ross MI, Johnson MM et al. Predictors and natural history of in-transit melanoma after sentinel lymphadenectomy. *Ann Surg Oncol 2005; 12(8):587-96*
2. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol 2009; 27(36):6199-206*
3. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol 2001; 19(16):3635-48*
4. Meier F, Will S, Ellwanger U et al. Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol 2002; 147(1):62-70*
5. Cascinelli N, Bufalino R, Marolda R et al. Regional nonnodal metastases of cutaneous melanoma. *Eur J Surg Oncol 1986; 12(2):175-80*
6. Calabro A, Singletary SE, Balch CM. Patterns of relapse in 1001 consecutive patients with melanoma nodal metastases. *Arch Surg 1989; 124(9):1051-5*

7. Zogakis TG, Bartlett DL, Libutti SK et al. Factors affecting survival after complete response to isolated limb perfusion in patients with in-transit melanoma. *Ann Surg Oncol 2001; 8(10):771-8*
8. Dong XD, Tyler D, Johnson JL et al. Analysis of prognosis and disease progression after local recurrence of melanoma. *Cancer 2000; 88(5):1063-71*
9. Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park) 2009; 23(6):488-96*
10. Creech O Jr, Ryan RF, Krementz ET. Regional chemotherapy by isolated perfusion in the treatment of melanoma of the extremities. *Plast Reconstr Surg Transplant Bull 1961; 28:333-46*
11. Creech O Jr, Krementz ET, Ryan RF et al. Chemotherapy of cancer: regional perfusion utilizing an extracorporeal circuit. *Ann Surg 1958; 148(4):616-32*
12. Kroon HM, Moncrieff M, Kam PC et al. Factors predictive of acute regional toxicity after isolated limb infusion with melphalan and actinomycin D in melanomapatients. *Ann Surg Oncol 2009; 16(5):1184-92*
13. Di Filippo F, Giacomini P, Rossi CR, Santinami M, Garinei R, Anzà M, Deraco M, Botti C, Perri P, Cavaliere F, Di Angelo P, Sofra C, Sperduti I, Pasqualoni R, Di Filippo S, Corrias F, Armenti A, Ferraresi V. Hyperthermic isolated perfusion with tumor necrosis factor-alpha and doxorubicin for the treatment of limb-threatening soft tissue sarcoma: the experience of the Italian Society of Integrated Locoregional Treatment in Oncology (SITILO). *In Vivo 2009 Mar-Apr; 23(2):363-7*
14. Liénard D, Eggermont AM, Koops HS, Kroon B, Towse G, Hiemstra S, Schmitz P, Clarke J, Steinmann G, Rosenkaimer F, Lejeune FJ. Isolated limb perfusion with tumour necrosis factor-alpha and melphalan with or without interferon-gamma for the treatment of in-transit melanoma metastases: a multicentre randomized phase II study. *Melanoma Res 1999 Oct; 9(5):491-502*
15. Fraker D, Alexander H, Ross M. A phase III trial of isolated limb perfusion for extremity melanoma comparing melphalan alone versus melphalan plus tumor necrosis factor (TNF) plus Interferon gamma (IFN). *Ann Surg Oncol 2002; 9:S8*
16. Eggermont AM, de Wilt JH, ten Hagen TL. Current uses of isolated limb perfusion in the clinic and a model system for new strategies. *Lancet Oncol 2003 Jul; 4(7):429-37*
17. Noorda EM, Vrouenraets BC, Nieweg OE, van Geel BN, Eggermont AM, Kroon BB. Isolated limb perfusion for unresectable melanoma of the extremities. *Arch Surg 2004 Nov; 139(11):1237-42*
18. Rossi CR, Mocellin S, Pilati P, Foletto M, Campana L, Quintieri L, De Salvo GL, Lise M. Hyperthermic isolated perfusion with low-dose tumor necrosis factor alpha and doxorubicin for the treatment of

limb-threatening soft tissue sarcomas. *Ann Surg Oncol 2005 May; 12(5):398-405. Epub 2005 Mar 29*
19. Kroon HM, Moncrieff M, Kam PC et al. Outcomes following isolated limb infusion for melanoma. A 14-year experience. *Ann Surg Oncol 2008; 15(11):3003-13*
20. Beasley GM, Caudle A, Petersen RP et al. A multi-institutional experience of isolated limb infusion: defining response and toxicity in the US. *J Am Coll Surg 2009; 208(5):706-15*
21. Marty M, Sersa G, Garbay JR, Gehl J et al. Electrochemotherapy F An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. *EJC Suppl 2006; 4:3-13*
22. Snoj M, Cemazar M, Slekovec Kolar B, Sersa G. Effective treatment of multiple unresectable skin melanoma metastases by electrochemotherapy: case report. *Croat Med J 2007; 48:345-9*
23. Quaglino P, Mortera C, Osella-Abate S, Barberis M et al. Electrochemotherapy with intravenous bleomycin in the local treatment of skin melanoma metastases. *Ann Surg Oncol 2008; 15:2215-22*
24. Campana LG, Mocellin S, Basso M, Puccetti O et al. Bleomycin based electrochemotherapy: clinical outcome from a single institution's experience with 52 patients. *Ann Surg Oncol 2009; 16:191-9*
25. Mir LM. Therapeutic perspectives of in vivo cell electropermeabilization. *Bioelectrochemistry 2001; 53(1):1-10*
26. Orlowski S, Belehradek J Jr, Paoletti C, Mir LM. Transient electropermeabilization of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochem Pharmacol 1988; 37:4727-33*
27. Sersa G, Cemazar M, Miklavcic D. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum(II) in mice. *Cancer Res 1995; 55:3450-5*
28. Mir LM, Gehl J, Sersa G, Collins CG et al. Standard operating procedures of the electrochemotherapy: instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator (TM) by means of invasive or non-invasive electrodes. *EJC Supplements 2006; 4:14-25*
29. Sersa G. The state-of-the-art of electrochemotherapy before the ESOPE study; advantages and clinical uses. *EJC Suppl 2006; 4:52-9*
30. Byrne CM, Thompson JF. Role of electrochemotherapy in the treatment of metastatic melanoma and other metastatic and primary skin tumors. *Expert Rev Anticancer Ther 2006; 6:671-815*
31. Mir LM, Glass LF, Sersa G, Teissié J et al. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Br J Cancer 1998; 77:2336-42*

32. Heller R, Jaroszeski M, Perrott R, Messina J et al. Effective treatment of B16 melanoma by direct delivery of bleomycin using electrochemotherapy. *Melanoma Res 1997; 7:10-8*
33. Sersa G, Stabuc B, Cemazar M, Miklavcic D et al. Electrochemotherapy with cisplatin: clinical experience in malignant melanoma patients. *Clin Cancer Res 2000; 6:863-7*
34. Bloom DC, Goldfarb PM. The role of intratumour therapy with electroporation and bleomycin in the management of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Surg Oncol 2005; 31:1029-35*
35. Byrne CM, Thompson JF, Johnston H, Hersey P et al. Treatment of metastatic melanoma using electroporation therapy with bleomycin (electrochemotherapy). *Melanoma Res 2005; 15:45-51*

10.4 Metastasi a distanza

Il trattamento chirurgico dei pazienti con metastasi a distanza (IV stadio AJCC) può avere finalità palliativa o curativa.
La prima va considerata per metastasi resecabili sintomatiche che impattano negativamente sulla qualità della vita o che possono divenire sintomatiche nell'arco di vita prevedibile, valutando attentamente i rischi dell'intervento a fronte del possibile beneficio.
La chirurgia citoriduttiva può essere proposta solo come propedeutica alla radioterapia od alla terapia medica (chemioterapia, immunoterapia, terapie *target*, ecc.).
L'indicazione alla chirurgia curativa scaturisce dalla documentata sopravvivenza a 5 anni del 20-30%, in casi selezionati, non ottenibile con altra attuale terapia sistemica. In un recente studio su pazienti al IV stadio, è stata registrata una sopravvivenza a 2 anni del 40% (1) (Tabella 1).

Tabella 1 Sopravvivenza a 2 anni dopo chirurgia radicale per metastasi a distanza

	%
John Wayne Cancer Institute (5)	45
University of Alabama (13)	16
M.D. Anderson Cancer Center (14)	15
Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (15)	21
Roswell Park Memorial Institute (16)	31
Columbia University (17)	38
Sidney Melanoma Unit (18)	22

da: Thompson JF, Morton DL, Balch CM and Ross MI. Surgical excision of distant melanoma metastases. In Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, et al. Cutaneous Melanoma. *Fifth Edition St Louis Quality Medical Publishing, 2009, pp 603-627*

La migliorata tecnologia diagnostica (TAC PET, RMN, Ecografia, ecc.), il perfezionamento delle misure anestesiologiche, il fatto che nell'86% dei casi la metastasi è unica, insieme alla possibilità di riresecare eventuali successive ripetizioni o di candidare il paziente ad altre terapie sistemiche, sono tutti argomenti a favore di un approccio almeno inizialmente chirurgico.

Selezione dei pazienti e fattori prognostici

Diversi parametri possono essere utilizzati per valutare l'indicazione ad una chirurgia ad intento curativo:

sede e resecabilità: la sopravvivenza media a 5 anni decresce progressivamente per cute e sottocute, linfonodi a distanza, apparato gastrointestinale, polmone, ossa, fegato e cervello (2);

numero di metastasi: la sopravvivenza media crolla se da una singola metastasi si passa a più di tre in un organo: 23 verso 8 mesi;

numero di organi coinvolti: la sopravvivenza mediana di 7 mesi per un organo coinvolto si riduce a 2 mesi per più di 3 organi;

intervallo libero di malattia: la sopravvivenza mediana del 15% a 5 anni, per intervalli < 36 mesi, sale al 30% per intervalli più lunghi (3);

tempo di raddoppiamento delle metastasi: il tempo di raddoppiamento dei diametri di una metastasi polmonare, valutato su una lastra *standard* postero-anteriore del torace, sembra riflettere il comportamento biologico e l'operabilità della lesione. La sopravvivenza mediana a 5 anni è pari a zero se il tempo di raddoppiamento è < 60 giorni e del 20,7% se il tempo di raddoppiamento è ≥ 60 giorni (4).

L-lattato deidrogenasi (LDH): in pazienti con metastasi epatiche, l'elevazione di LDH fa scendere la sopravvivenza mediana da 11 a 3 mesi;

performance status: anche questo parametro viene generalmente considerato significativo ai fini della valutazione dell'indicazione chirurgica.

Sedi specifiche

Cute, sottocute e linfonodi

Queste sono le localizzazioni frequentemente sedi di ripetizioni metastatiche.

Il rimedio elettivo è quello chirurgico con un margine > 1 cm (5).
La comparsa di lesioni multiple e sequenziali, in una o più aree, può richiedere il ricorso, oltre alla chirurgia, di altre modalità terapeutiche: elettrochemioterapia, perfusione o infusione ipertermica, radioterapia, iniezione intralesionale di BCG e chemioterapia.

Distretto toraco-polmonare
I polmoni sono la sede più frequente di coinvolgimento metastatico viscerale nei pazienti con melanoma cutaneo: studi autoptici hanno mostrato il coinvolgimento polmonare nel 70% dei casi. L'incidenza è variabile dal 12% al 36% dei casi come primo evento metastatico; nella maggior parte dei casi, tale localizzazione è asintomatica e solo nel 25% si presenta con tosse, dispnea e febbre.
L'accuratezza delle indagini strumentali permette più facilmente l'identificazione precoce di noduli piccoli e solitari per i quali la chirurgia rappresenta il miglior trattamento.
La terapia chirurgica delle metastasi polmonari, in pazienti selezionati e con buoni indici prognostici, offre le migliori possibilità di cura, con una sopravvivenza mediana intorno ai 20 mesi e circa del 20% a 5 anni, nella maggioranza delle casistiche (6).
Le ripetizioni endobronchiali, o raramente a trachea e laringe, possono in alternativa alla chirurgia essere trattate, dopo conferma endoscopica, con laserterapia o radioterapia.

Sistema nervoso
Il coinvolgimento del parenchima cerebrale è frequente nei pazienti con melanoma ed è indice di malattia terminale con una sopravvivenza misurabile in mesi. L'incidenza raggiunge il 75% ed è la causa del decesso nel 50% dei pazienti. Nel 25-50% dei casi si presenta come lesione singola, localizzata nel parenchima cerebrale.
Il trattamento chirurgico deve essere considerato come terapia di scelta se la sede è facilmente accessibile e non esistono altre localizzazioni sistemiche. La sopravvivenza media riportata è di 8,7 mesi ed una sopravvivenza a 5 anni del 5% dei casi (7).
Numerosi studi tendono a dimostrare che il trattamento radiante, dopo exeresi chirurgica di una lesione solitaria, riduce l'incidenza di recidive cerebrali, senza però prolungare la sopravvivenza (8).
Metastasi al midollo spinale sono molto rare e richiedono urgenti misure decompressive chirurgiche, radioterapiche ed alte dosi di corticosteroidi (9).

Tratto gastrointestinale
Più di qualunque altra neoplasia, il melanoma cutaneo metastatizza al tratto gastroenterico: il 50% dei pazienti con malattia avanzata ha localizzazioni intestinali. Nel 75-90% dei casi è coinvolto il piccolo intestino, nel 20-25% il colon e nel 3-16% lo stomaco.
Nella maggior parte dei casi, l'interessamento intestinale è sintomatico: nel 60% c'è anemizzazione per sanguinamento occulto, nel 26-40% rettorragia e nel 27% occlusione intestinale. Il trattamento chirurgico rappresenta l'opzione terapeutica principale, sia per ottenere la radicalità della malattia, sia come palliazione sintomatica. Spesso il sanguinamento richiede trasfusioni frequenti, per cui la resezione chirurgica migliora notevolmente la qualità di vita. Il trattamento chirurgico è curativo in molti casi con una sopravvivenza media che raggiunge 15-49 mesi, rispetto a 5-8 mesi dei casi non operati (10).
Talora, un *by-pass* può essere sufficiente a risolvere un'ostruzione ed evitare la sindrome da intestino corto.

Distretto epatosplenico
La prognosi per i pazienti con metastasi epatiche è, in media, limitata a 4 mesi, ma la resezione completa della lesione può prolungare la sopravvivenza mediana a 28 mesi (11).
Il panorama terapeutico può essere ulteriormente ampliato da radiofrequenza o criochirurgia per lesioni multiple.
Le metastasi epatiche da melanoma oculare riconoscono una migliore prognosi con sopravvivenza a 5 anni nell'ordine del 20%.
Metastasi singole localizzate alla colecisti possono richiedere la colecistectomia (12).
Ripetizioni spleniche sono rare e generalmente associate a malattia sistemica, ma anche per questa localizzazione la splenectomia offre migliori prospettive di sopravvivenza.

Ossa
Il trattamento delle metastasi ossee è limitato alla terapia del dolore ed a consentire la deambulazione, con interventi di stabilizzazione.
La compromissione vertebrale impone interventi tempestivi e decompressivi.

Altre sedi

Cuore, pericardio, ghiandole endocrine, ovaio, utero, testicolo, faringe, occhio ed orbita possono tutti essere sedi metastatiche.

L'opzione chirurgica può essere di volta in volta considerata sia in senso palliativo sia curativo, valutando l'eventuale unicità della lesione ed il rapporto rischi/benefici a seconda delle condizioni generali e locali.

BIBLIOGRAFIA

1. Morton DL, Mozzillo N, Thompson JF et al. An International, randomized, phase III trial of bacillus Calmette-Guerin (BCG) plus allogeneic melanoma vaccine (MCV) or placebo after complete resection of melanoma metastatic to regional or distant sites. *J Clin Oncol 2007; 25:8508*
2. Francken AB, Accort NA, Shaw HM, Wiener M, Soong S, Hoekstra HJ, Thompson JF. Prognosis and determinants of outcome following locoregional or distant recurrence in patients with cutaneous melanoma. *Ann Surg Oncol 2008; 15(5):1426-84*
3. Leo F, Cagini L, Rocmas P, Cappello M, Van Geel AN, Maggi G, Goldstraw P, Pastorino U. Lung metastases from melanoma: when is surgical treatment warrented? *Br J Surg 2000; 83(5):569-72*
4. Ollila DW, Stern SL, Morton DL. Tumor doubling time: a selection factor for pulmonary resection of metastatic melanoma. *J Surg Oncol 1998; 69:206-11*
5. Essner R, Lee JH, Wanek LA et al. Contemporary surgical treatment of advanced-stage melanoma. *Arch Surg 2004; 139(9):961-6*
6. Ollila DW. Complete metastasectomy in patients with stage IV metastatic melanoma. *Lancet Oncol 2006 Nov; 7:919-24*
7. Fife KM, Colman MH, Stevens GN, Firth LC, Moon D, Shannon KF, Harman R, Petersen-Schaefer K, Zacest AC, Besser M, Milton GW, McCarthy WH, Thompson JF. Determinants of outcome in melanoma patients with cerebral metastases. *J Clin Oncol 2004 Apr; 22:1293-300*
8. Tsao MN, Lloyd NS, Wong RK, Rakovitch E, Chow E, Laperriere N. Supportive Care Guidelines Group of Cancer Ontario's Program in Evidence-based Care. Radiotherapeutic management of brain metastases: a systematic review and meta-analyses. *Cancer Treat Rev 2005 Jun; 31(4):256-73*
9. Patchell RA, Tibbs PA, Regine WF, Payne R, Saris S, Kryscio RJ, Mohiuddin M, Young B. Direct decompressive surgical resection in the

treatment of spinal cord compression caused by metastatic cancer: a randomized trial. *Lancet 2005 Aug; 366(9486):643-8*
10. Sanki A, Scolyer RA, Thompson JF. Surgery for melanoma metastases of the gastrointestinal tract: indications and results. *Eur J Surg Oncol 2009 Mar; 35:313-9*
11. Rose DM, Essner R, Hughes TM, Tang PC, Bilchik A, Wanek LA, Thopson JF, Morton DL. Surgical resection for metastatic melanoma to the liver: the John Wayne Cancer Institute and Sydney Melanoma Unit experience. *Arch Surg 2001 Aug; 136(8):950-5*
12. Marone U, Caracò C, Losito S, Daponte A, Chiofalo MG, Mori S, Cerra R, Pezzullo L, Mozzillo N. Laparoscopic cholecystectomy for melanoma metastatic to the gallbladder: is it an adequate surgical procedure? Report of a case and review of the literature. *World J Surg Oncol 2007 Dec 11; 5:141*
13. Wormon IL, Smith JW, Soong SJ, et al. Surgery as palliative treatment for distant matastases of melanoma. *Ann Surg 1986; 204(2):181-5*
14. Feun LG, Gutterman Jj, Brugess MA, et al. The natural history of resectable metastatic melanoma (Stage IVA melanoma). *Cancer 1982; 50(8):1656-63*
15. Overett TK, ShiuMH. Surgical treatment of distant metastatic melanoma. Indications and results. *Cancer 1985; 56(5):1222-30*
16. Karakousis CP, Velez A, Driscoll DL, et al. Metastasectomy in malignat melanoma. *Surgery 1994; 115(3):295-302*
17. Agrawal S, Yao TJ, Coit DG. Surgery for melanoma metastatic to the gastrointestinal tract. *Ann Surg Oncol 1999 Jun;6(4):336-44*
18. La Hei ER, Thompson JF, McCaughan BC, et al. Surgical resection of pulmonary metastatic melanoma : a review of 83 thoracotomies. *Asia Pacific Heart J 1996;5:111-14*

11.0 TRATTAMENTO MEDICO

11.1 Chemioterapia
11.2 Immunoterapia
11.3 Vaccinoterapia
11.4 Target Therapy

11.1 Chemioterapia

Aspetti generali

La chemioterapia comprende tutte le sostanze chimiche interferenti in modo diretto od indiretto con i meccanismi di replicazione del DNA cellulare, capaci di ridurre proliferazione e sopravvivenza delle cellule tumorali e delle cellule normali rapidamente o costantemente proliferanti (cellule midollari, mucose, radice capelli, bulbi piliferi). I chemioterapici agiscono su bersagli definiti benché non selettivi, a differenza delle sostanze *target*. L'indice terapeutico è dipendente dalla cinetica proliferativa delle cellule tumorali e/o da *deficit* nei meccanismi di replicazione e riparazione e/o dal maggiore contenuto in acidi nucleici, che aumenta il bersaglio.

L'azione può essere diretta al DNA, che viene danneggiato in modo più o meno reversibile (alchilanti, Platino e derivati, antibiotici antitumorali), od interferire o bloccare la sintesi di metaboliti necessari per la replicazione del DNA (antimetaboliti), od interagire con la formazione del fuso mitotico e col citoscheletro cellulare (alcaloidi della Vinca, Taxani).

La non selettività comporta tossicità sulle cellule sane in replicazione e condiziona le dosi e gli intervalli di somministrazione.

Il melanoma è catalogato fra le neoplasie ad elevata chemioresistenza sia intrinseca sia indotta, caratteristica legata all'elevata capacità di espellere gli agenti chemioterapici, che penetrano nelle cellule ed alla aumentata capacità di riparo del danno sugli acidi nucleici.

A ciò si aggiunge un'aumentata resistenza all'apoptosi, che fa sì che l'effetto citotossico sia modesto e/o di breve durata. In questa revisione è sinteticamente riassunto il ruolo della chemioterapia nel melanoma metastatico, considerando sia i singoli agenti, sia la chemioterapia di combinazione, sia le combinazioni di chemio

ed immunoterapia, sia le combinazioni di chemioterapia con terapie *target*.
La prognosi della malattia metastatica, mediamente di 8-9 mesi con meno del 5% di probabilità di sopravvivenza oltre i 5 anni in presenza di metastasi viscerali (1), dovrebbe migliorare con la registrazione dell'anticorpo monoclonale anti-CTLA4 (Ipilimumab) e degli inibitori specifici di BRAF mutato, anche se risultati su larga scala ed a lungo termine non sono ancora disponibili.
Sicuramente è iniziata una fase nuova, che porterà a riconsiderare e posizionare diversamente la chemioterapia e, soprattutto, a ridefinire per gli studi di fase III lo *standard* di riferimento, finora costituito dalla Dacarbazina o dalla Temozolomide in monoterapia.
Di recente, il concetto che la chemioterapia influenzi negativamente l'immunoterapia è in via di revisione, sulla base di numerosi studi preclinici (2) e di iniziali risultati di studi clinici pilota, che indicano come la chemioterapia (Dacarbazina) possa incrementare l'immunità vaccino-indotta in pazienti a rischio di recidiva di melanoma, in termini di ampliamento del repertorio del recettore delle cellule T e di prolungamemto della memoria (3) o in pazienti con malattia avanzata (4).

Chemioterapici usati come agenti singoli
Dacarbazina e Temozolomide
La Dacarbazina (5-(3,3-Dimetil-1-triazeno)-imidazolo-4-carbossamide) è stato il primo farmaco approvato per il trattamento del melanoma e per 30 anni il chemioterapico di riferimento *standard*, pur non essendo mai stato documentato un aumento di sopravvivenza rispetto a terapie di supporto o a placebo o ad altri trattamenti.
E' un alchilante che agisce metilando gli acidi nucleici, in particolare DNA, causando rotture dell'elica che portano all'inibizione della sintesi sia di DNA sia di RNA. Inoltre, interagisce con gruppi sulfidrilici, inibendo la sintesi proteica e non è fase specifico. Viene attivato dai microsomi epatici in Mitozolomide attraverso la via del citocromo P450, supera in modesta quantità (nel 15% dei casi) la barriera emato-cerebrale.
L'attività storicamente riportata era del 22%, con maggior efficacia nei pazienti con limitato carico tumorale e con metastasi non viscerali (5).
In realtà, negli studi randomizzati condotti negli ultimi 10 anni, l'efficacia registrata appare sensibilmente inferiore, con percentuali di risposta che variano dal 5% al 12% (6-11) e con un tempo mediano

di progressione da 1,5 a 2,8 mesi, circa il 2% dei pazienti è sopravvivente a 5 anni. Dosi singole di 850-1.000 mg/m^2 ogni 3-4 settimane sono ben tollerate ed equivalenti alle somministrazioni frazionate, pertanto rappresentano lo *standard* di riferimento negli studi di fase III.
La Temozolomide è il metabolita attivo, orale, della Dacarbazina. La molecola è lipofila e raggiunge concentrazioni efficaci a livello cerebrale, la biodisponibilità è praticamente del 100% con un picco di concentrazione dopo un'ora dall'assunzione a stomaco vuoto, l'emivita è di 1,8 ore e non richiede attivazione epatica.
Gli studi di confronto evidenziano un'attività non inferiore alla Dacarbazina, con una sopravvivenza mediana di 7,7 verso 6,4 mesi; un tempo alla progressione di 1,9 verso 1,5 mesi ed un lieve vantaggio sulla qualità di vita (7). La dose *standard* è di 200 mg/m^2/die per 5gg ogni 28. Tentativi di aumentare l'efficacia con dosi prolungate non hanno sortito gli effetti attesi. Nei pazienti che presentano metilazione del gene *MGMT* (Metil-Guanina-Metil-Transferasi), valutata sul tessuto tumorale, la sensibilità al farmaco è spiccata. Il melanoma è la terza neoplasia per incidenza di metastasi cerebrali; il passaggio della barriera emato-encefalica da parte del farmaco ha portato a valutare un suo effetto sull'incidenza delle metastasi cerebrali. Diversi studi di fase II hanno indotto a ritenere che ci potesse essere una diminuita incidenza o un significativo ritardo nello sviluppo di metastasi cerebrali sostituendo la Dacarbazina con la Temozolomide, sia in monochemioterapia sia in combinazioni (9-15). L'unico studio prospettico randomizzato su questo *end-point* non ha evidenziato differenze significative né sull'incidenza né sul tempo di comparsa né sulle caratteristiche di presentazione (16).
Lo studio di confronto fra Dacarbazina e Temozolomide (7), essendo indirizzato a testare la superiorità di quest'ultima, non ha portato alla registrazione del farmaco. Dacarbazina o Temozolomide rimangono, internazionalmente, il trattamento utilizzabile per i pazienti candidati a chemioterapia. L'inserimento in protocolli di studio, quando disponibili, rimane prioritario.

Fotemustina e nitrosouree
La Fotemustina appartiene alla famiglia delle nitrosouree, utilizza il trasporto attivo degli aminoacidi per attraversare la membrana cellulare. Come tutte le nitrosouree, è caratterizzata da spiccata lipofilia, che favorisce il passaggio della barriera emato-encefalica. Alla dose convenzionale di 100 mg/m^2, l'emivita è di 34 minuti,

non influenzata dalla funzionalità renale. Il farmaco, sviluppato in Francia a fine anni '80, non è approvato né dall'FDA né dall'EMA, pur essendo registrato per il trattamento del melanoma metastatico in diversi Paesi europei, fra cui l'Italia. I primi studi riportavano, in prima linea, percentuali di risposte globali del 24%, con un 27% di stabilizzazioni ed un 5-8% di risposte complete, con attività anche a livello cerebrale e tossicità prevalentemente ematologica, più raramente epatica e cutanea (20,21).
La percentuale di risposte obiettive, pur ridimensionata negli studi di fase III, sia a livello sistemico sia cerebrale (9,22), rimane comunque lievemente, anche se non statisticamente, superiore a quella della Dacarbazina a livello sistemico. E' ritenuta superiore a livello cerebrale, ma manca uno studio di confronto fra Fotemustina e Dacarbazina o Temozolomide, che lo confermi.
La Fotemustina ha sostituito del tutto, almeno in Italia, l'uso delle altre nitrosouree (Carmustina, Lomustina, Semustina), con le quali sono stati riportati tassi di risposta variabili dal 13% al 18%.
Tutte le nitrosouree causano mielodepressione prolungata.

Platino e suoi derivati
I sali del platino, Cisplatino e Carboplatino, agiscono come alchilanti, formando legami intra e cross-elica di DNA, deformando la struttura ed impedendo la replicazione cellulare. Il Cisplatino ha un'emivita plasmatica di 58-73 ore. L'eliminazione avviene prevalentemente per via urinaria, dipende dalla funzionalità renale, con *clearance* nella norma si arriva al 74% di eliminazione nelle prime 24 ore.
Il Carboplatino ha un'emivita di circa 100 minuti e circa il 70% è eliminato per via urinaria. Efficacia e tossicità sono strettamente dipendenti dalla *clearance* renale e la dose da somministrare viene calcolata in base a questa.
Sia il Cisplatino sia il Carboplatino hanno modesta attività come agenti singoli: circa il 15% di risposte con durata mediana di 3 mesi. Tentativi di aumentare la risposta con l'aumento di dose non hanno prodotto i risultati attesi. L'Oxaliplatino apparentemente più attivo *in vitro* non ha prodotto alcuna risposta in 10 pazienti pretrattati.

Taxani ed alcaloidi della Vinca
I taxani impiegati nel trattamento del melanoma metastatico sono il Paclitaxel, il Docetaxel e l'Abraxane.
Nessuno dei 3 farmaci è registrato per il melanoma.

Il Paclitaxel promuove il precoce assembramento dei microtubuli e previene la normale depolimerizzazione, necessaria per la mitosi e la divisione cellulare, provocando la morte cellulare nelle fasi G2 e M del ciclo. In studi di fase II, ha prodotto tassi di risposta del 12-14% con durata di risposta > 6 mesi (23-26). Non risulta cross-resistente con la Dacarbazina e viene utilizzato sia in monoterapia sia in combinazione col Carboplatino (27).
Il Docetaxel si lega alla tubulina libera promuovendo l'assembramento dei microtubuli ed impedendo la mitosi. E' stato utilizzato sia singolarmente, con percentuali di risposta del 12% (28), sia in combinazione con Temozolomide o Dacarbazina con un incremento delle risposte obbiettive (29-31), ma non esistono studi di confronto.
L'Abraxane è una formulazione di Paclitaxel coniugato ad Albumina, che ne incrementa l'indice terapeutico; in uno studio di fase II ha ottenuto un tasso di risposta del 21% usato da solo (32) e del 25% in associazione a Carboplatino con sopravvivenza mediana di 10 mesi (33).
Lo studio di fase III, che confronta l'effetto dell'Abraxane con quello della Dacarbazina, ha completato l'arruolamento dei pazienti nel maggio 2011 ed i risultati dovrebbero essere disponibili prossimamente.
Fra gli alcaloidi della Vinca, i più utilizzati nel melanoma sono Vindesina, Vinblastina e Vinorelbina.
La Vinblastina si lega alle proteine microtubulari arrestando la mitosi in metafase, farmaco fase specifico (fase M) attivo anche in fase S.
La Vindesina, derivato sintetico della Vinblastina, ha analogo meccanismo d'azione e tendenza all'accumulo per dosaggi ripetuti.
La Vinorelbina, derivato semisintetico della Vinblastina, blocca la mitosi in fase G2-M. Per tutti questi farmaci, i tassi di risposta riportati sono attorno al 14% (34).

Chemioterapia di combinazione

La prognosi dei pazienti con melanoma metastatico dipende dalla sede delle metastasi, dal numero di organi coinvolti e di metastasi presenti, dai livelli di LDH, dal *performance status* del paziente e dai neutrofili circolanti (1,35). Considerata la diversa combinazione di queste variabili nelle varie casistiche e l'effetto di ciascuna sulla prognosi, non è difficile capire l'estrema variabilità di risultati fra i diversi studi di fase II e III.
I modesti vantaggi osservati con agenti singoli e la mancanza di alternative hanno indotto a combinare, spesso in totale assenza

di razionali biologici, più chemioterapici in una miriade di combinazioni che è impossibile e forse inutile considerare in modo completo. Le combinazioni più frequenti sono state a 2 farmaci con la Dacarbazina o a 3 farmaci con aggiunta di alcaloidi della Vinca ed una nitrosourea. Gli studi di fase II con 2 agenti hanno prodotto tassi di risposta dal 10% al 20% con scarsa evidenza di superiorità rispetto alla sola Dacarbazina. Gli studi di fase II con 3 o 4 farmaci hanno prodotto percentuali di risposta anche del 30-50%. Le combinazioni più utilizzate sono state: CVD (Cisplatino, Vinblastina o Vindesina e Dacarbazina) ed il regime di Darmouth (Cisplatino, Dacarbazina, BCNU e Tamoxifene). Con la combinazione CVD le risposte sono state del 40%, con 4% di risposte complete e durata mediana di 9 mesi (36). Lo studio di fase III ha ottenuto il 19% di risposte nel braccio CVD ed il 14% nel braccio Dacarbazina, senza differenze in durata e sopravvivenza.

Il regime di Darmouth da un 46% di risposte con una durata mediana di 7 mesi nella fase II è sceso nella fase III al 18,5% di risposte verso un 10% con Dacarbazina, con una sopravvivenza mediana di 7 mesi in entrambi i bracci ed un aumento significativo di tossicità nel braccio di combinazione (6). La combinazione di Carboplatino e Taxolo utilizzata come braccio di controllo in studi di seconda linea (27) ha ottenuto risposte simili a quelle con Dacarbazina e non essendo risultata cross-resistente a questa, è utilizzata come trattamento di seconda linea in diversi Paesi europei e negli Stati Uniti.

Complessivamente, con la chemioterapia di combinazione si può ottenere un maggior numero di risposte, ma a prezzo di un aumento significativo di tossicità senza incrementi di sopravvivenza (37,38). Nel 2008 Korn et al. (39) hanno pubblicato una meta-analisi su 42 studi di fase II, con l'obiettivo di fissare parametri di riferimento che facilitassero la selezione delle combinazioni o dei trattamenti meritevoli di passare ad una fase III. In questa meta-analisi, la mediana di sopravvivenza si attesta sui 6,2 mesi con un 25,5% di pazienti viventi a 1 anno, una mediana di sopravvivenza libera da progressione (PFS) di 1,7 mesi e PFS a 6 mesi del 14,5%. Questa analisi, sicuramente utile, non ha eliminato la necessità del confronto diretto, in considerazione dei molteplici fattori clinici e biologici che influenzano risposta, durata e sopravvivenza.

Combinazioni di chemioterapia con agenti immunomodulanti (bio-CT)
Per bio-chemioterapia (bio-CT) si è inteso generalmente la combinazione di Interferone e/o Interleukina-2 con chemioterapia.
Ad oggi non esiste, e probabilmente non esisterà mai, uno studio di confronto della Dacarbazina o Temozolomide da sola con un regime di bio-CT. Confronti sono stati fatti fra Dacarbazina o Temozolomide o Fotemustina da sole o rispettivamente combinate con Interferone alfa ricombinante, generalmente a dosi basse o intermedie somministrato per via sottocutanea. In genere, si è osservato un aumento delle risposte, soprattutto di quelle durature, ma la sopravvivenza globale non è mai risultata significativamente aumentata. Lo stesso si può dire per combinazioni più complesse di 3-4 chemioterapici associati ad Interferone ed Interleukina-2, sia sottocute sia endovena. Valutando i singoli studi, i tassi di risposta sono spesso incrementati, ma non la sopravvivenza, mentre è significativamente incrementata la tossicità.
L'analisi di 18 studi per un totale di 2.621 pazienti conferma il risultato di non superiorità della bio-CT rispetto alla CT in termini di efficacia ed il dato negativo è rafforzato dalla conferma dell'incremento significativo di tossicità (40).

Chemioterapia in combinazione con nuovi farmaci
La Temozolomide, usata a basse dosi prolungate in associazione a Talidomide, ha dimostrato un tasso di risposte del 32% (38), dato che non è stato confermato in studi successivi.
Il Sorafenib, inibitore multi-*target* di BRAF mutato e non, di VEGFR2, di PDGFRβ, di c-KIT, di FIT-3, in combinazione con Carboplatino e Paclitaxel ha prodotto, in fase II, un 31% di risposte ed un 54% di stabilizzazioni. Lo studio di fase III non ha confermato questo risultato (27).
L'associazione di Dacarbazina ed Oblimersen (oligonucleotide antisenso anti *BCL-2*), pur producendo un significativo aumento di risposte rispetto alla sola CT, non ha incrementato in modo significativo la sopravvivenza, se non nel sottogruppo con LDH 2 volte inferiore al limite normale (42).
L'unico farmaco che finora ha prodotto un incremento di sopravvivenza rispetto alla Dacarbazina associata a placebo è stato l'Ipilimumab associato a Dacarbazina (43). La superiorità osservata, sia in termini di durata di risposta sia di mediana di sopravvivenza globale, non sembra, ad un confronto indiretto con un altro studio di fase III, superiore all'Ipilimumab utilizzato da solo (44). Infatti, la percentuale

di controllo della malattia e la sopravvivenza a 1, 2 e 3 anni sono molto simili, pur trattandosi di trattamento di prima linea nella combinazione con Dacarbazina e di seconda linea nel trattamento con solo Ipilimumab, oltretutto utilizzando un dosaggio 3 volte inferiore e senza fase di mantenimento (vedi sottocap. 11.2 e cap. 14.0).
Il risultato sembra pertanto attribuibile interamente all'Ipilimumab e non ci sono evidenze per consigliarne l'uso in associazione a Dacarbazina.
Altre associazioni (Ipilimumab e Fotemustina) sono allo studio e qualora i dati fossero incoraggianti dovranno essere validati.

BIBLIOGRAFIA

1. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol 2009; 27(36):6199-206*
2. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol 2008 Jan; 8(1):59-73*
3. Palermo B, Del Bello D, Sottini A, Serana F, Ghidini C, Gualtieri N, Ferraresi V, Catricalà C, Belardelli F, Proietti E, Natali PG, Imberti L, Nisticò P. Dacarbazine treatment before peptide vaccination enlarges T-cell repertoire diversity of melan-a-specific, tumor-reactive CTL in melanoma patients. *Cancer Res 2010 Sep 15; 70(18):7084-92*
4. Kyte JA, Gaudernack G, Dueland S, Trachsel S, Julsrud L, Aamdal S. Telomerase peptide vaccination combined with temozolomide: a clinical trial in stage IV melanoma patients. *Clin Cancer Res 2011 Jul 1; 17(13):4568-80*
5. Bellett RE, Mastrangelo MJ, Laucius JF, Bodurtha AJ. Randomized prospective trial of DTIC (NSC-45388) alone versus BCNU (NSC-409962) plus vincristine (NSC-67574) in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Cancer Treat Rep 1976; 60(5):595-600*
6. Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS et al. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol 1999; 17(9):2745-51*
7. Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol 2000; 18(1):158-66*

8. Chiarion Sileni V, Nortilli R, Aversa SM, Paccagnella A, Medici M, Corti L et al. Phase II randomized study of dacarbazine, carmustine, cisplatin and tamoxifen versus dacarbazine alone in advanced melanoma patients. *Melanoma Res 2001; 11(2):189-96*
9. Avril MF, Aamdal S, Grob JJ, Hauschild A, Mohr P, Bonerandi JJ et al. Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J Clin Oncol 2004; 22(6):1118-25*
10. Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U et al. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol 2006; 24(29):4738-45*
11. Schadendorf D, Ugurel S, Schuler-Thurner B, Nestle FO, Enk A, Brocker EB et al. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol 2006; 17(4):563-70*
12. Paul MJ, Summers Y, Calvert AH, Rustin G, Brampton MH, Thatcher N et al. Effect of temozolomide on central nervous system relapse in patients with advanced melanoma. *Melanoma Res 2002; 12(2):175-8*
13. Atkins MB, Gollob JA, Sosman JA, McDermott DF, Tutin L, Sorokin P et al. A phase II pilot trial of concurrent biochemotherapy with cisplatin, vinblastine, temozolomide, interleukin 2, and IFN-alpha 2B in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res 2002; 8(10):3075-81*
14. Ridolfi R, Romanini A, Sileni VC, Michiara M, Guida M, Biasco G et al. Temozolomide and interferon-alpha in metastatic melanoma: a phase II study of the Italian Melanoma Intergroup. *Melanoma Res 2004; 14(4):295-9*
15. Ron IG, Sarid D, Ryvo L, Sapir EE, Schneebaum S, Metser U et al. A biochemotherapy regimen with concurrent administration of cisplatin, vinblastine, temozolomide (Temodal), interferon-alfa and interleukin-2 for metastatic melanoma: a phase II study. *Melanoma Res 2006; 16(1):65-9*
16. Ready N, Aronson F, Wanebo H, Kennedy T. A low rate of central nervous system progression in a phase II trial of outpatient chemobiologic therapy with cisplatin, temozolomide, interleukin-2, and interferon alfa 2-B for metastatic malignant melanoma. *Am J Clin Oncol 2005; 28(5):479-84*
17. Weber RW, O'Day S, Rose M, Deck R, Ames P, Good J et al. Low-dose outpatient chemobiotherapy with temozolomide, granulocyte-macrophage colony stimulating factor, interferon-alpha2b, and recombinant interleukin-2 for the treatment of metastatic melanoma. *J Clin Oncol 2005; 23(35):8992-9000*

18. Gonzalez Cao M, Malvehy J, Marti R, Conill C, Sanchez M, Martin M et al. Biochemotherapy with temozolomide, cisplatin, vinblastine, subcutaneous interleukin-2 and interferon-alpha in patients with metastatic melanoma. *Melanoma Res 2006; 16(1):59-64*
19. Chiarion-Sileni V, Guida M, Ridolfi L, Romanini A, Del Bianco P, Pigozzo J et al. Central nervous system failure in melanoma patients: results of a randomised, multicentre phase 3 study of temozolomide- and dacarbazine- based regimens. *Br J Cancer 2011; 104(12):1816-21*
20. Jacquillat C, Khayat D, Banzet P, Weil M, Fumoleau P, Avril MF et al. Final report of the French multicenter phase II study of the nitrosourea fotemustine in 153 evaluable patients with disseminated malignant melanoma including patients with cerebral metastases. *Cancer 1990; 66(9):1873-8*
21. Falkson CI, Falkson G, Falkson HC. Phase II trial of fotemustine in patients with metastatic malignant melanoma. *Invest New Drugs 1994; 12(3):251-4*
22. Mornex F, Thomas L, Mohr P, Hauschild A, Delaunay MM, Lesimple T et al. [Randomised phase III trial of fotemustine versus fotemustine plus whole brain irradiation in cerebral metastases of melanoma]. *Cancer Radiother 2003; 7(1):1-8*
23. Legha SS, Ring S, Papadopoulos N, Raber M, Benjamin RS. A phase II trial of taxol in metastatic melanoma. *Cancer 1990; 65(11):2478-81*
24. Zimpfer-Rechner C, Hofmann U, Figl R, Becker JC, Trefzer U, Keller I et al. Randomized phase II study of weekly paclitaxel versus paclitaxel and carboplatin as second-line therapy in disseminated melanoma: a multicentre trial of the Dermatologic Co-operative Oncology Group (DeCOG). *Melanoma Res 2003; 13(5):531-6*
25. Einzig AI, Hochster H, Wiernik PH, Trump DL, Dutcher JP, Garowski E et al. A phase II study of taxol in patients with malignant melanoma. *Invest New Drugs 1991; 9(1):59-64*
26. Hodi FS, Soiffer RJ, Clark J, Finkelstein DM, Haluska FG. Phase II study of paclitaxel and carboplatin for malignant melanoma. *Am J Clin Oncol 2002; 25(3):283-6*
27. Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U, Hogg D, Robert C, Hersey P et al. Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J Clin Oncol 2009; 27(17):2823-30*
28. Bedikian AY, Weiss GR, Legha SS, Burris HA 3rd, Eckardt JR, Jenkins J et al. Phase II trial of docetaxel in patients with advanced cutaneous malignant melanoma previously untreated with chemotherapy. *J Clin Oncol 1995; 13(12):2895-9*
29. Kim KB, Hwu WJ, Papadopoulos NE, Bedikian AY, Camacho LH, Ng C et al. Phase I study of the combination of docetaxel,

temozolomide and cisplatin in patients with metastatic melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol 2009; 64(1):161-7*
30. Bafaloukos D, Aravantinos G, Fountzilas G, Stathopoulos G, Gogas H, Samonis G et al. Docetaxel in combination with dacarbazine in patients with advanced melanoma. *Oncology 2002; 63(4):333-7*
31. Yoon C, Papadopoulos NE, Camacho LH, McIntyre S, Alvarado GC, Bedikian AY et al. The clinical efficacy of combination of docetaxel and temozolomide in previously treated patients with stage IV melanoma. *Melanoma Res 2010; 20(1):43-7*
32. Hersh EM, O'Day SJ, Ribas A, Samlowski WE, Gordon MS, Shechter DE et al. A phase 2 clinical trial of nab-paclitaxel in previously treated and chemotherapy-naive patients with metastatic melanoma. *Cancer 2010; 116(1):155-63*
33. Kottschade LA, Suman VJ, Amatruda T 3rd, McWilliams RR, Mattar BI, Nikcevich DA et al. A phase II trial of nab-paclitaxel (ABI-007) and carboplatin in patients with unresectable stage IV melanoma: a North Central Cancer Treatment Group Study, N057E(1). *Cancer 2011; 117(8):1704-10*
34. Quagliana JM, Stephens RL, Baker LH, Costanzi JJ. Vindesine in patients with metastatic malignant melanoma: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol 1984; 2(4):316-9*
35. Schmidt H, Suciu S, Punt CJ, Gore M, Kruit W, Patel P et al. Pretreatment levels of peripheral neutrophils and leukocytes as independent predictors of overall survival in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV Melanoma: results of the EORTC 18951 Biochemotherapy Trial. *J Clin Oncol 2007; 25(12):1562-9*
36. Legha SS, Ring S, Papadopoulos N, Plager C, Chawla S, Benjamin R. A prospective evaluation of a triple-drug regimen containing cisplatin, vinblastine, and dacarbazine (CVD) for metastatic melanoma. *Cancer 1989; 64(10):2024-9*
37. Nashan D, Muller ML, Grabbe S, Wustlich S, Enk A. Systemic therapy of disseminated malignant melanoma: an evidence-based overview of the state-of-the-art in daily routine. *J Eur Acad Dermatol Venereol 2007; 21(10):1305-18*
38. Huncharek M, Caubet JF, McGarry R. Single-agent DTIC versus combination chemotherapy with or without immunotherapy in metastatic melanoma: a meta-analysis of 3273 patients from 20 randomized trials. *Melanoma Res 2001; 11(1):75-81*
39. Korn EL, Liu PY, Lee SJ, Chapman JA, Niedzwiecki D, Suman VJ et al. Meta-analysis of phase II cooperative group trials in metastatic stage IV melanoma to determine progression-free and overall survival benchmarks for future phase II trials. *J Clin Oncol 2008; 26(4):527-34*
40. Ives NJ, Stowe RL, Lorigan P, Wheatley K. Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma: a

meta-analysis of 18 trials involving 2,621 patients. *J Clin Oncol 2007; 25(34):5426-34*

41. Hwu WJ, Krown SE, Menell JH, Panageas KS, Merrell J, Lamb LA et al. Phase II study of temozolomide plus thalidomide for the treatment of metastatic melanoma. *J Clin Oncol 2003; 21(17):3351-6*
42. Agarwala SS, Keilholz U, Gilles E, Bedikian AY, Wu J, Kay R et al. LDH correlation with survival in advanced melanoma from two large, randomised trials (Oblimersen GM301 and EORTC 18951). *Eur J Cancer 2009; 45(10):1807-14*
43. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, M DJ, Garbe C et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med 2011; 364(26):2517-26*
44. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med 2010; 363(8):711-23*

11.2 Immunoterapia

Il melanoma rappresenta da sempre un modello di applicazione dell'immunoterapia. Questo perché è stata da tempo dimostrata una risposta cellulare ed anticorpale verso antigeni noti delle cellule di melanoma. Alcuni antigeni del melanoma riconosciuti da linfociti T sono stati identificati molecolarmente: antigeni di differenziamento cellulare melanocitario (Melan-A/MART-1, gp100, TRP e tirosinasi), antigeni *cancer testis* (MAGE, BAGE e GAGE, NY-ESO-1 e PRAME), antigeni indotti da alterazioni nello *splicing* di mRNA (TRP-1), e pan-antigeni tumorali quali la proteina anti-apoptotica Survivina. Questi antigeni sono stati considerati candidati per un'immunoterapia specifica, aspetto che sarà trattato nel sottocapitolo 11.3 "Vaccinoterapia". Inoltre, sono stati evidenziati fenomeni di autoimmunità, come la vitiligine, che spesso accompagnano la risposta al trattamento, regressioni spontanee (seppur rare) di malattia metastatica e del tumore primitivo e lunga durata delle risposte ottenute con la terapia immunologica.
L'attività dell'immunoterapia non può essere valutata con i classici criteri applicati nel disegno degli studi di chemioterapia e questo spiega i risultati spesso contraddittori ed inconcludenti degli studi che hanno proposto l'immunoterapia con l'Interleukina-2 (approvata in USA e non in Europa). La risposta clinica, in realtà, spesso non rappresenta un *end-point* surrogato di sopravvivenza. Il tipico beneficio di un immunoterapico si manifesta con lunghe stabilizzazioni, a volte precedute da iniziali progressioni di malattia. Infatti, i tempi di ottenimento di una risposta immunologica sono assai variabili, essendo essa condizionata dal *background* genetico dell'ospite e dalle caratteristiche genetiche del tumore (1).
Un altro concetto legato all'immunoterapia è quello di riuscire a controllare la crescita tumorale qualora la malattia sia in una fase iniziale ovvero quanto minore è la quantità di tumore da distruggere. Questo spiega come l'immunoterapia abbia trovato un impiego principalmente nella terapia adiuvante, sebbene più recentemente i nuovi farmaci immunomodulanti abbiano dimostrato attività anche nella fase avanzata di malattia.

Terapia adiuvante
Una serie di studi condotti negli ultimi 30 anni hanno dimostrato come, ad oggi, nessun trattamento chemioterapico od immunoterapico

con modificatori della risposta biologica quali Levamisolo, BCG, Interleukina-2 abbia fornito un vantaggio in sopravvivenza nella terapia adiuvante del melanoma. Una più accurata stadiazione del melanoma, la classificazione AJCC, permette l'identificazione dei pazienti a sufficiente rischio per giustificare l'impiego di una terapia adiuvante sistemica. In base ad essa, i pazienti possono essere classificati in rischio basso (IB e IIA), intermedio (IIB e IIIA) ed alto di ricaduta (IIC, IIIB e IIIC).

L'unico modificatore della risposta biologica (o citochina) approvato è l'Interferone (IFN) alfa-2 sulla base dello studio di Kirkwood et al. (2) (1996), che dimostrava un vantaggio sia in termini di sopravvivenza libera da malattia (DFS) sia di sopravvivenza globale (OS) nei pazienti trattati con alte dosi di IFN alfa-2b (ECOG 1684) rispetto al braccio di controllo. Una serie di studi condotti negli ultimi 25 anni con IFN alfa-2a ed alfa-2b a differenti dosi, *schedule* e tempi di trattamento hanno incorporato tutte le categorie di pazienti a rischio di ricaduta. Il reale beneficio clinico, le modalità ottimali di trattamento (dose, durata, via di somministrazione), l'entità e la gestione degli effetti collaterali sono ancora oggi tema di controversie, discussioni e limitazioni all'utilizzo clinico. Molti studi con IFN, pur non ottenendo un aumento significativo della OS, hanno mostrato un vantaggio significativo in DFS (French CGM, Austrian MMCG, ECOG1690, EORTC18991).

Tuttavia, una meta-analisi degli studi EORTC 18952 e 18991 ha dimostrato un beneficio anche come OS per il gruppo di pazienti con melanoma primitivo ulcerato in stadio IIB-IIIN1/N2 (3).

Gli studi clinici che si sono succeduti negli anni hanno interessato popolazioni disomogenee per stadiazione, per chirurgia (linfonodo sentinella) e per modalità di *follow-up* (ecografia linfonodale), e non permettono una comparazione diretta tra i vari studi. Considerando la numerosità necessaria per dimostrare piccole differenze e la durata di molti studi (> 5 anni), questi vanno valutati con aspetto critico e costruttivo per cercare di derivarne considerazioni che possano consentire un atteggiamento condivisibile nell'approccio al paziente con rischio di recidiva.

Una recente meta-analisi pubblicata da Mocellin et al. (4), aggiunta alle precedenti di Wheatley et al. (5,6), permette alcune considerazioni per un atteggiamento condiviso nell'uso in adiuvante dell'IFN nel melanoma.

In particolare, Wheatley et al. (5) nel 2007 hanno considerato 13 studi randomizzati internazionali per un totale di 6.067 pazienti. È stato utilizzato il metodo *standard Individual Patient Data* (IPD) *meta-analysis*, che prevede l'uso di un *database* individuale dei pazienti al fine della valutazione dei risultati. L'IPD è stato ottenuto per 10 dei 13 studi considerati e per l'85% dei pazienti.
Gli studi sono stati suddivisi secondo il dosaggio di IFN in alte dosi (HDI: 20 MU/m^2 mese seguito da 11 mesi a 10 MU per 3 volte la settimana), dosi intermedie (IDI: 5-10 MU), basse dosi (LDI: 3 MU per 3 volte la settimana per 18-24 mesi) e dosi molto basse (VLDI: 1 MU). È stata anche eseguita un'analisi dei sottogruppi, in relazione all'età del paziente, sesso e caratteristiche della malattia. Il risultato di questo studio ha mostrato un beneficio assoluto in termini di sopravvivenza totale per i pazienti trattati con melanoma del 3% (CI: 1-5%) indipendente dal dosaggio e dalla durata del trattamento.
Mocellin et al. hanno eseguito una meta-analisi *standard* considerando 14 studi clinici randomizzati per un totale di 8.122 pazienti. Questa rappresenta la meta-analisi con il maggior numero di pazienti considerati. L'analisi dei risultati ha mostrato che l'IFN ha un impatto statisticamente significativo nei pazienti con melanoma ad alto rischio di recidiva, sia sulla DFS, con una riduzione del rischio relativo del 18% (HR: 0,82, CI: 0,77-0,87), sia sull'OS, con una riduzione del rischio relativo dell'11% (HR: 0,89, CI: 0,83-0,96).
L'analisi dei sottogruppi ha inoltre evidenziato che negli studi con arruolamento esclusivo di pazienti in stadio III di malattia non è stato riscontrato alcun beneficio statisticamente significativo per l'OS, così come non è stato dimostrato alcun vantaggio nel trattamento con IFN negli studi che hanno utilizzato HDI. Allo stesso modo, non è stata evidenziata significatività in rapporto alla durata od al dosaggio. Infatti, considerando il dosaggio di IFN, i risultati dell'analisi dei sottogruppi non hanno evidenziato alcun vantaggio o svantaggio di HDI rispetto a LDI o IDI. Va segnalato che l'impatto dell'IFN sull'OS rimaneva statisticamente significativo solo quando venivano considerati gli studi clinici che utilizzavano LDI o IDI.
Sebbene nessuno studio clinico preso singolarmente e nessuna delle meta-analisi finora condotte aiutino ad identificare la dose ideale o la schedula più vantaggiosa o la durata ottimale del trattamento con IFN nella terapia adiuvante dei melanomi a rischio intermedio-alto, tuttavia, indipendentemente da tali parametri o dalla formulazione peghilata o meno, la riduzione del rischio di recidiva ed in minor

misura del rischio di morte è sempre consistente ed a vantaggio del braccio IFN. Tuttavia, il fatto che non emergano differenze fra dosi e durata non esclude che ci possano essere.
In sintesi, le 2 meta-analisi dimostrano che il trattamento adiuvante con IFN procura un beneficio assoluto in termini di sopravvivenza del 3%, con una riduzione del rischio relativo del 18% sulla DFS e dell'11% sull'OS. Questa è la base di discussione sull'uso dell'IFN adiuvante nel melanoma. Queste percentuali, soprattutto quella relativa al beneficio assoluto, sono simili alle percentuali ottenute dai trattamenti adiuvanti più importanti usati in oncologia in altri tumori come quello della mammella, del colon-retto e dell'ovaio e la diversità di significatività dei singoli studi è sostenuta dalla numerosità e dall'omogeneità di selezione dei pazienti, più che dall'attività intrinseca del trattamento.
Attualmente, la ricerca clinica si rivolge da una parte verso il tentativo di migliorare le *schedule* di somministrazione dell'IFN, ad esempio impiegando la formulazione peghilata, e dall'altra verso impiego di nuovi immunoterapici come l'anti-CTLA4 (studio 029 EORTC) e la vaccinazione con MAGE, studi che confrontano tali farmaci verso il placebo e di cui proprio quest'anno si è chiuso l'arruolamento.

Immunoterapia del melanoma metastatico
La sopravvivenza per i pazienti con melanoma metastatico è bassa, con percentuali a 2 anni comprese tra il 10% ed il 20%. Sebbene in studi clinici randomizzati la Dacarbazina non abbia mai mostrato di migliorare la sopravvivenza, è il farmaco di riferimento perché comunque fornisce una percentuale di risposte tra il 5% ed il 20% (7).
L'immunoterapia in senso lato è l'unica strategia terapeutica che ha dimostrato di fornire, anche se in un piccolo sottogruppo di pazienti, lunghe e durature sopravvivenze.
Nell'ambito di tale terapia si possono includere:

- i modificatori della risposta biologica o più precisamente le citochine;
- la terapia cellulare adottiva specifica;
- la vaccinoterapia (vedi sottocap. 11.3);
- la terapia genica;
- gli anticorpi immunomodulanti.

Citochine

Le 2 citochine maggiormente studiate sono l'IFN alfa-2 e l'Interleukina-2 (IL-2). IFN alfa-2 (a e b) è una citochina con attività immunoregolatoria, antiproliferativa, che induce la differenziazione cellulare e ha attività apoptotica ed antiangiogenica. In studi di fase I-II produce risposte obiettive nel 15% circa di pazienti ed ancora oggi rappresenta una valida possibilità terapeutica nei pazienti con melanoma al IV stadio con minima diffusione di malattia.

L'IL-2 ad alte dosi ha dimostrato un effetto antitumorale con e senza le cellule LAK (*Lymphokine-Activated Killer*). L'analisi retrospettiva di 8 studi clinici condotti tra il 1985 ed il 1993, che hanno arruolato 270 pazienti, ha dimostrato risposte nel 16% dei pazienti, con risposte durevoli nel tempo nel 4% dei pazienti, suggerendo la possibilità dell'attivazione di una memoria immunologica (8).

Entrambe le citochine sono state studiate in molti studi di fase II-III, in combinazione con mono o poli-chemioterapia (schema classico quello dell'*MD Anderson* di polichemioterapia con Cisplatino, Dacarbazina e Vinblastina associato a IL ed IFN); purtroppo, nessuno studio ha dimostrato un vantaggio in sopravvivenza a favore della combinazione, a scapito peraltro di una tossicità cumulativa con la chemioterapia.

Immunoterapia adottiva

Consiste nell'identificazione *in vitro* di linfociti autologhi estratti dal tumore (TILs, *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*) con attività antitumorale, nell'espansione di queste cellule e nella loro infusione nel paziente. Questa strategia terapeutica ha una serie di vantaggi rispetto alle altre terapie come la specificità antitumorale, ma ha il limite dell'inabilità delle cellule infuse di persistere per lungo tempo *in vivo* nell'ospite. I primi studi con i TILs hanno mostrato risposte antitumorali transitorie. Questo approccio è stato modificato con l'utilizzo di TILs coltivati per breve tempo e con l'aggiunta di una chemioterapia linfodepletiva e non mieloablativa con Ciclofosfamide e Fludarabina prima dell'infusione, associata in un secondo tempo all'irradiazione toto-corporea. Queste modifiche, basate su un razionale sviluppato in modelli animali, hanno prodotto percentuali di risposta più alte ed una più lunga sopravvivenza dei TILs *in vivo* (50-70% di risposte obiettive) (9), a fronte di elevati costi e tossicità ed attuabile solo in Centri ultraspecialistici.

Terapia genica

Sulla scorta dei risultati ottenuti con i TILs, Rosenberg et al. (10) hanno condotto una serie di studi trasducendo i TILs con geni che codificano per recettori che aumentano la risposta immune riconoscendo antigeni specifici (TCRs) o geni che inducono la produzione di citochine come IL-2 o IL-15. L'approccio è limitato a pochi Centri in grado di riprodurlo, ma la terapia genica con il TILs sembra una strategia davvero promettente per questa patologia.

Un altro approccio di terapia genica consiste nell'uso di Allovectin-7, un plasmide a DNA che contiene il gene *HLA-B7*. Viene somministrato per via intra-lesionale, nel tentativo di aumentare l'immunogenicità delle cellule tumorali. Sono stati condotti 2 studi di fase II, che hanno mostrato risposte obiettive del 10-15% talora accompagnate da regressione di metastasi a distanza. Si è recentemente concluso l'arruolamento di uno studio randomizzato di fase III in pazienti in stadio M1a e b, che confrontava l'Allovectin-7 con la Dacarbazina in monoterapia (11).

Gli anticorpi immunomodulanti

Le nuove strategie terapeutiche includono anticorpi immunomodulanti che antagonizzano il recettore che sopprime la risposta immune come anti-CTLA4 ed anti-PD1 od anticorpi che attivano i recettori che amplificano la risposta immune come anti-OX40 e anti-CD40. Tutti sono attualmente in sperimentazione di fase I, II, eccetto Ipilimumab. Ipilimumab, in particolare, è stato il primo farmaco a dimostrare un vantaggio in sopravvivenza nel melanoma metastatico. Ipilimumab è un anticorpo IgGl che blocca il CTLA4 (antigene associato ai linfociti T), che esercita un'attività regolatoria negativa, aumentando quindi l'attivazione e la proliferazione delle cellule T (12).

Due studi randomizzati di fase III hanno indicato un vantaggio in DFS ed OS sia in monoterapia sia in combinazione con la Dacarbazina.

Il primo è uno studio di fase III (a 3 bracci) che confronta Ipilimumab 3 mg/kg in combinazione con il vaccino gp100, Ipilimumab in monoterapia o gp100 da solo. I pazienti ricevevano Ipilimumab per 4 somministrazioni in seconda linea di trattamento. Lo studio ha dimostrato di fornire un vantaggio in OS sia per il braccio della combinazione sia per quello del solo Ipilimumab verso il gp100 da solo (OS mediana 10,0 vs 6,4 mesi, HR di morte: 0,68; $p<0,001$) (13).

Nel secondo studio, Robert et al. (14) confrontavano Dacarbazina + Ipilimumab verso Dacarbazina + placebo: la

sopravvivenza globale è stata significativamente superiore nel braccio Ipilimumab + Dacarbazina (11,2 vs 9,1 mesi), con una più alta percentuale di sopravvivenza a favore di Ipilimumab-Dacarbazina ad 1 anno (47,3% vs 36,3%), a 2 anni (28,5% vs 17,9%), ed a 3 anni (20,8% vs 12,2%). Le curve di sopravvivenza globale e libera da malattia sono assolutamente sovrapponibili nei 2 studi, indicando, per la prima volta nella storia della terapia del melanoma in IV stadio, un beneficio in sopravvivenza.

La terapia con gli anticorpi immunomodulanti presenta nuovi tipi di tossicità dovuta ad un'attivazione del sistema immunitario che consiste in fenomeni autoimmuni verso l'ospite, come tiroidite, ipofisite, tossicità gastroenterica con colite e diarrea e tossicità cutanea (*rush* e vitiligo). Tutti questi effetti collaterali sono in genere gestibili con algoritmi specifici che prevedono l'uso di terapia steroidea ed interruzione del trattamento in caso di tossicità grado III e IV.

Per questo motivo, Ipilimumab è stato recentemente approvato dalla FDA e dall'EMEA per il trattamento del melanoma metastatico.

Lo scenario della terapia del melanoma avanzato è quindi cambiato. Attualmente, pur essendo ancora numerose le sfide da intraprendere, si dispone di farmaci a bersaglio molecolare e di immunoterapici che sono diventati lo *standard* della terapia e forse, per la prima volta dopo anni di risultati insoddisfacenti, si può dire che esistono opzioni terapeutiche valide, oltre a quella di entrare in uno studio clinico controllato.

BIBLIOGRAFIA

1. Wholchock JD, Hoos A, O'Day S et al. Guidelines for evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune related response criteria. *Clin Cancer Res 2009; 15:714-20*
2. Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol 1996 Jan; 14(1):7-17*
3. Eggermont A, Suciu S, Testori A, Patel P, Spatz A, EORTC Melanoma Group. Ulceration of primary melanoma and responsiveness to adjuvant interferon therapy: Analysis of the adjuvant trials EORTC18952 and EORTC18991 in 2,644 patients. *J Clin Oncol 2009; 27(15s) Abstract 9007*

4. Mocellin S, Pasquali S, Rossi CR, Nitti D. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Nat Cancer Inst 2010 Apr. 7; 102(7):493-501*
5. Wheatley K, Ives N, Eggermont A et al. Interferon-a as adjuvant therapy for melanoma: an individual patient data meta-analysis of randomised trials [2007 ASCO Meeting abstract 8526]. *J Clin Oncol 2007*; *25*(*18S*):*8526*
6. Wheatley K, Ives N, Hancock B, et al. Does adjuvant interferon-alpha for high-risk melanoma provide a worthwhile benefit? A meta-analysis of the randomised trials. *Cancer Treat Rev 2003; 29(4):241-52*
7. Gogas HJ, Kirkwood JM, Sondak WK. Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change? *Cancer 2007; 109 (3):455-64*
8. Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A, Kirkwood JM. Systematic review of medical treatment in melanoma: Current status and future prospects.*Oncologist 2011; 16(1):5-24. Epub 2011 Jan 6. Review*
9. Weber J, Atkins M, Hwu P, Weber J, Atkins M, Hwu P, Radvanyi L, Sznol M, Yee C; Immunotherapy Task Force of the NCI Investigational Drug Steering Committee. White Paper on Adoptive Cell Therapy for Cancer with Tumor-Infiltrating Lymphocytes: A Report of the CTEP Subcommittee on Adoptive Cell Therapy. *Clin Cancer Res 2011 April 1; 17(7):1664-73*
10. Rosenberg SA. Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer-what clinicians need to know. *Nat Rev Clin Oncol 2011 Aug 2; doi: 10.1038/nrclinonc.2011.116*
11. Chowdery R, Gonzales R. Immunologic therapy targeting metastatic melanoma: allovectin 7. *Immunotherapy 2011 Jan; 3(1):17-21*
12. Melero J, Hervas-Strubbs S, Glennie M et al. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nat Rev Cancer 2007; 7:95-106*
13. Hodi FS, O'Day SJ, Mc Dermott DF et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med 2010; 363:211-23*
14. Robert C, Thomas L, Bondarenko I et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med 2011 Jun 30; 364(26):2517-26*

11.3 Vaccinoterapia

Tra i tumori maligni umani di differente istotipo, il melanoma cutaneo rappresenta senza dubbio "il modello" di neoplasia solida ampiamente utilizzato in laboratorio ed in clinica per studiare l'interazione tra le cellule tumorali ed il sistema immunitario dell'ospite, nonché per definire nuove strategie terapeutiche ed identificare nuove molecole quale possibile bersaglio di terapia. Diversi fenomeni contribuiscono a suggerire il diretto coinvolgimento del sistema immunitario nel riconoscimento e nel controllo delle cellule di melanoma, tra questi:

i) la regressione tumorale spontanea identificata in pazienti con melanoma primitivo, sebbene con bassa frequenza (1);

ii) la frequente presenza di infiltrato linfocitario anti-tumorale all'interno della lesione neoplastica (2);

iii) l'associazione di fenomeni autoimmuni, diretti contro antigeni condivisi tra le cellule normali e neoplastiche del *lineage* melanocitario, che possono portare allo sviluppo di vitiligine, che correla con un aumento della sopravvivenza dei pazienti (3) e con una migliore risposta a trattamenti immunologici (4).

Sulla scorta di queste informazioni, dalla fine degli anni '80, numerosi studi si sono focalizzati sulla caratterizzazione di molecole espresse dalle cellule neoplastiche, che rappresentassero bersagli ottimali della risposta immunitaria melanoma-specifica. Ciò ha consentito l'identificazione di diverse categorie di antigeni associati al melanoma (AAM) (5), che possono essere riconosciuti come estranei dal sistema immunitario dell'ospite, evocando una risposta immunitaria umorale e/o cellulo-mediata diretta contro le cellule tumorali AAM-positive. Numerosi AAM, attualmente noti, sono considerati promettenti candidati per il disegno e lo sviluppo di nuovi approcci immunoterapeutici, diagnostici e/o prognostici.
Di seguito, sono descritte le principali categorie in cui possono essere classificati gli AAM finora identificati nel melanoma umano (Tabella 1).

Tabella 1 Classificazione degli Antigeni Associati al Melanoma

Categoria	*Antigene*
Cancer Testis Antigens	Famiglie dei geni *MAGE*, *NY-ESO*, *SSX*, superfamiglie dei geni *GAGE/PAGE/XAGE*
Antigeni di differenziazione	*Tirosinasi, Melan-A/MART-1*, *gp100/Pmel17*, *TRP-1/gp75*
Antigeni iperespressi	*PRAME*
Antigeni unici o da mutazione	*β-catenina*, *CDK-4*, *MUM-1*, *caspasi 8*, *BRAF, tirosin- fosfatasi*
Antigeni melanoma-specifici	*TRP-2/INT2*
Antigeni glicolipidici e glicoproteici	*GM2*, *GD2*, *GD3*, *antigene ad alto peso molecolare associato al melanoma (HMW-MAA)*

1. ***Cancer Testis Antigens (CTA).*** I CTA rappresentano bersagli ideali per lo sviluppo di vaccini antitumorali, in quanto sono espressi in tumori umani di diversa origine istologica, incluso il melanoma, ma non nei tessuti normali, ad eccezione della placenta, degli spermatogoni e degli spermatociti nel testicolo (per tale motivo sono anche denominati antigeni tumorali della linea germinale). Inoltre, i CTA sono costitutivamente immunogenici *in vivo*.
Benché prevalentemente riconosciuti dai linfociti T, nel contesto di allospecificità HLA di classe I e/o II, i CTA possono anche presentare epitopi riconosciuti da cellule B e, quindi, sono in grado di evocare una risposta immunitaria umorale, oltre che T cellulare. L'espressione dei CTA nel testicolo e nella placenta non rappresenta un potenziale bersaglio per una reazione immunologica, poiché le cellule in tali organi non esprimono molecole HLA di classe I, identificando quindi i CTA come bersaglio immunologico tumore-specifico.
L'espressione dei CTA nei tumori è il risultato della riattivazione di geni normalmente silenziati nelle cellule adulte normali, come conseguenza di fenomeni di demetilazione di residui di citosina nel contesto di dinucleotidi CpG nel loro promotore (6).
Al contrario, nelle cellule non tumorali la metilazione di questi siti inibisce il legame di fattori di trascrizione attivanti e porta al

silenziamento del gene. Emergenti evidenze sperimentali hanno dimostrato che una deregolazione della metilazione genomica, che ricorre nel corso della trasformazione neoplastica, può fornire nuovi bersagli terapeutici per il trattamento del melanoma, grazie alla riespressione di antigeni tumorali, quali appunto i CTA. Tuttavia, la progressione tumorale può talora associarsi ad un'aberrante ipermetilazione del DNA, che contribuisce all'assente o down-regolata espressione di differenti componenti del complesso di riconoscimento tumorale (antigeni HLA di classe I, CTA e molecole accessorie/costimolatorie), limitando così il potenziale immunogenico delle cellule neoplastiche. Studi sperimentali *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che l'espressione dei CTA può essere indotta od amplificata con l'uso di agenti ipometilanti il DNA, quali la 5-aza-2'-deossicitidina (5-AZA-CdR). Queste modificazioni antigeniche modulano positivamente l'immunogenicità ed il riconoscimento immunitario delle cellule neoplastiche, rendendo la 5-AZA-CdR di notevole interesse per il disegno di nuovi regimi combinati chemio-immunoterapici per il trattamento di pazienti affetti da melanoma (7). Sebbene l'identificazione di nuovi CTA sia in continua crescita, quelli attualmente noti e più utilizzati in protocolli clinici di immunoterapia sono le famiglie dei geni MAGE, NY-ESO, SSX e le superfamiglie dei geni GAGE/PAGE/XAGE.

2. Antigeni tessuto-specifici o di differenziazione. Sono AAM espressi sulle cellule normali e sulle cellule neoplastiche dello stesso *lineage* cellulare. Rivestono un importante ruolo sotto il profilo clinico, in quanto possono essere impiegati come bersagli per approcci d'immunoterapia specifica o come marcatori diagnostici per l'identificazione dell'istotipo di origine della neoplasia (ad es. S-100). Nel melanoma e nei melanociti molti di questi AAM sono coinvolti nella biosintesi della melanina (ad esempio, tirosinasi, Melan-A/MART-1, gp100/Pmel17, TRP-1/gp75).

3. Antigeni iperespressi. Sono AAM espressi nei tessuti tumorali in quantità più elevata rispetto al corrispondente tessuto sano e sono presenti in tumori di diverso istotipo (ad esempio, PRAME). E' verosimile che i livelli di espressione di questi antigeni non superino, nei tessuti normali, la soglia necessaria a determinare il loro riconoscimento da parte del sistema immunitario, mentre la loro iperespressione nei tessuti tumorali determina la rottura della tolleranza

immunologia ed il successivo riconoscimento immune delle cellule trasformate.

4. Antigeni unici ed individuali. Gli AAM unici traggono origine da mutazioni puntiformi di geni normali espressi ubiquitariamente (ad esempio, β-catenina, CDK4, MUM-1, caspasi 8, *BRAF*), le cui modificazioni molecolari spesso accompagnano la trasformazione neoplastica o la progressione tumorale. Questi AAM sono espressi esclusivamente nei tumori individuali, a livello dei quali sono identificati, in quanto è altamente improbabile che la stessa mutazione possa ricorrere casualmente in tumori di pazienti diversi. Gli AAM unici sono teoricamente i bersagli più specifici per l'immunoterapia, ma a questo potenziale vantaggio si contrappone un quasi impossibile loro utilizzo clinico, poiché possono indurre una risposta immunologica solo contro il tumore d'origine su cui sono stati trovati.

5. Antigeni melanoma-specifici. Derivano da alterazioni nei meccanismi di *splicing* e sono espressi solo sulle cellule tumorali e non sulla controparte di cellule normali (ad esempio, TRP-2/INT2).

6. Antigeni glicolipidici e glicoproteici. A questa categoria appartengono diverse glicoproteine e glicolipidi di membrana, espressi ad alti livelli e/o con uno stato di glicosilazione aberrante in neoplasie di istotipo diverso, incluso il melanoma (ad esempio, GM2, GD2, GD3 e HMW-MAA, antigene ad alto peso molecolare associato al melanoma). Questi antigeni sono ampiamente utilizzati come bersagli di immunoterapia sia passiva sia attiva, in quanto contengono epitopi carboidratici e peptidici altamente tumore-specifici ed in grado di indurre risposte immunitarie prevalentemente umorali, ma anche cellulari.
La disponibilità di ampie conoscenze sull'immunobiologia delle cellule di melanoma e sui meccanismi molecolari che ne regolano l'interazione con il sistema immunitario del paziente hanno portato allo sviluppo ed all'applicazione clinica di innumerevoli strategie di immunoterapia in pazienti affetti da melanoma. Tra queste, un ruolo significativo è svolto dalla "vaccinoterapia", strategia che utilizza differenti agenti terapeutici anche molto diversi tra loro (ad esempio, vaccini peptidici e proteici ricombinanti, vaccini cellulari, anticorpi anti-idiotipici), al fine di attivare o potenziare una risposta immunitaria tumore-specifica in grado di controllare la progressione di malattia. E' utile sottolineare che, per quanto riguarda il trattamento

di tumori umani, sarebbe preferibile utilizzare il termine "vaccinazione terapeutica" in quanto vengono vaccinati soggetti che hanno già sviluppato il tumore e che possono essere in diverso stadio clinico di malattia. Al contrario dei vaccini utilizzati correntemente per la prevenzione dello sviluppo di malattie infettive, non esistono infatti, al momento, vaccini anti-tumorali preventivi, che possano quindi essere utilizzati per prevenire lo sviluppo di neoplasie.
E' oltre lo scopo di questo paragrafo una disamina esaustiva di tutti i vaccini terapeutici che sono stati e sono attualmente utilizzati per il trattamento di pazienti affetti da melanoma; è importante però ricordare che essi sono ancora agenti sperimentali, che stanno mostrando sempre di più il loro potenziale terapeutico. A tal proposito, un recente studio ha dimostrato che l'associazione di un vaccino basato sulla proteina gp100, somministrato in associazione ad Interleukina-2, migliora significativamente la progressione libera da malattia in pazienti affetti da melanoma avanzato, con un *trend* verso la significatività per quanto riguarda la sopravvivenza (8). Peraltro, è stato recentemente concluso l'arruolamento di un ampio numero pazienti affetti da melanoma in stadio III di malattia in uno studio di fase III, che ne prevedeva il trattamento con la proteina ricombinante MAGE-3 nel *setting* adiuvante (9). Altri studi di fase II, che utilizzano differenti CTA (ad esempio, NY-ESO-1 o MAGE) quali *target* terapeutici, sono attualmente in corso nella malattia metastatica.
In conclusione, pur trattandosi ancora di una strategia sperimentale, disponibile presso selezionati Centri specializzati, la vaccinoterapia trova ampio spazio nell'ambito delle sperimentazioni cliniche sul melanoma cutaneo. E' indubbio che i risultati degli studi in corso porteranno importanti indicazioni sul vantaggio che i vaccini terapeutici possono fornire ai pazienti affetti da melanoma sia quando essi vengono utilizzati da soli sia quando somministrati in associazione ad altri agenti immunoterapeutici, quali ad esempio gli anticorpi immunomodulanti (anti-CTLA-4, anti-PD-1) che sono in grado, utilizzati da soli, di migliorare significativamente la sopravvivenza di pazienti affetti da melanoma metastatico (10).

BIBLIOGRAFIA

1. Tefany FJ, Barnetson RS, Halliday GM, McCarthy SW, McCarthy WH. Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in primary regressing and non-regressing malignant melanoma. *J Invest Dermatol 1991 Aug; 97(2):197-202*
2. Romero P, Dunbar PR, Valmori D, Pittet M, Ogg GS, Rimoldi D, Chen JL, Liénard D, Cerottini JC, Cerundolo V. Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med 1998 Nov 2; 188(9):1641-50*
3. Byrne KT, Turk MJ. New Perspectives on the Role of Vitiligo in Immune Responses to Melanoma. *Oncotarget 2011 Sep; 2(9):684-94*
4. Fujita M, High WA, Asgari S, Lewis KD, Gonzalez R. Development of vitiligo during melanoma treatment with a novel survivin inhibitor: a case report and review of the literature. *Int J Dermatol 2009 Apr; 48(4):426-30*
5. Boon T, Coulie PG, van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Ann Rev Immunol 2006; 24:175-208*
6. Fratta E, Coral S, Covre A, Parisi G, Colizzi F, Danielli R, Marie Nicolay HJ, Sigalotti L, Maio M. The biology of cancer testis antigens: putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol Oncol 2011 Apr; 5(2):164-82*
7. Sigalotti L, Covre A, Fratta E, Parisi G, Colizzi F, Rizzo A, Danielli R, Nicolay HJ, Coral S, Maio M. Epigenetics of human cutaneous melanoma: setting the stage for new therapeutic strategies. *J Transl Med 2010 Jun 11; 8:56*
8. Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J, Gailani F, Riley L, Conlon K, Pockaj B, Kendra KL, White RL, Gonzalez R, Kuzel TM, Curti B, Leming PD, Whitman ED, Balkissoon J, Reintgen DS, Kaufman H, Marincola FM, Merino MJ, Rosenberg SA, Choyke P, Vena D, Hwu P. gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med 2011 Jun 2; 364(22):2119-27*
9. Kirkwood JM, Dreno B, Hauschild A, Schadendorf D, Testori A, Hersey P, Jamoul C, Peeters O, Therasse P. DERMA phase III trial of MAGE-A3 antigen-specific cancer immunotherapeutic (ASCI) as adjuvant therapy in patients with MAGE-A3-positive resected stage III melanoma. *J Clin Oncol 2011; 29(15 suppl): abstract TPS232*
10. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, M D JW, Garbe C, Lebbe C, Baurain JF, Testori A, Grob JJ, Davidson N, Richards J, Maio M, Hauschild A, Miller WH Jr, Gascon P, Lotem M, Harmankaya K, Ibrahim R, Francis S, Chen TT, Humphrey R, Hoos A, Wolchok JD. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med 2011 Jun 30; 364(26):2517-26*

11.4 Target Therapy

La chemioterapia indica l'uso di composti chimici che bloccano la crescita tumorale. Fino a poco tempo fa, lo scopo del trattamento del melanoma metastatico non operabile poteva considerarsi quasi esclusivamente palliativo, dal momento che i chemioterapici a disposizione hanno dimostrato un effetto limitato e non curativo nella maggior parte dei casi.
La *target therapy* rappresenta una terapia mirata "a bersaglio molecolare", che dovrebbe consentire un trattamento specifico e selettivo di una determinata neoplasia attraverso inibizione/stimolazione di un bersaglio molecolare tipicamente alterato in quella determinata malattia. Almeno teoricamente, una terapia mirata o *target* dovrebbe essere più efficace e meno tossica perché più selettiva, anche se purtroppo non è sempre vero. Il primo esempio di *target therapy* nel melanoma è stato l'Oblimersen (2) ovvero un oligonucleotide antisenso per l'mRNA del gene *BCL-2*. Purtroppo, i risultati incoraggianti del suo uso nei pazienti affetti da melanoma non sono stati confermati dai successivi studi clinici (3). Altro esempio "storico" di *target therapy* nel melanoma è il Sorafenib. Tale molecola è un inibitore multichinasico (MTKi), che, oltre ad avere un'azione antiangiogenetica, possiede un effetto inibitorio sulle proteine BRAF e CRAF.

Classificazione molecolare del melanoma come principio base per terapie personalizzate e target.
Recentemente, è stato proposto uno schema di classificazione molecolare per il melanoma, che ha associato il livello di esposizione al sole con specifiche alterazioni genetiche e ha definito 4 sottotipi di melanoma (4). Melanomi associati con l'esposizione intermittente al sole (corrispondenti più o meno a quelli derivanti dalla trasformazione di nevi ed al tipo di melanoma a diffusione superficiale) sono caratterizzati dalla presenza di mutazioni in *BRAF* o *RAS*.
Melanomi insorti su cute esposta cronicamente al sole (più o meno corrispondente alla *lentigo maligna* melanoma) e melanomi originati su cute minimamente esposta al sole (compresi i melanomi acrali e delle mucose) sono caratterizzati da mutazioni percentualmente maggiori nel gene *c-KIT* e minori in *BRAF/RAS*. Questo modello è potenzialmente attraente in quanto le probabilità di aberrazioni genetiche associate con il melanoma possono essere previste

dalla posizione del melanoma primitivo e dal grado di esposizione al sole. Tuttavia, questo modello è inficiato dalla bassa prevalenza di mutazioni in *c-KIT* dei melanomi acrali-lentigginosi e mucosali. Inoltre, è stato evidenziato che le mutazioni in *BRAF* o *RAS* possono essere presenti indipendentemente dal grado di esposizione al sole, con una prevalenza simile o superiore a quella delle mutazioni in *c-KIT*, anche nei sottotipi acrali-lentigginosi e mucosali. Di conseguenza, l'approccio correntemente più pratico nella classificazione molecolare del melanoma cutaneo utilizza l'analisi mutazionale per *BRAF*, *RAS* e, in misura minore, per *c-KIT*. Le mutazioni presenti in questi geni rappresentano la base per le terapie mirate (*target therapy*) basate sull'inibizione funzionale "esclusiva" delle proteine mutate.

Inibitori di BRAF

Le mutazioni del gene *BRAF* sono state identificate come le mutazioni più frequenti e più importanti al fine di obiettivi con funzione di *target* nel melanoma. BRAF è una serina-treonina chinasi ed i suoi inibitori, quelli non selettivi e più recentemente quelli altamente selettivi, sono stati sviluppati negli ultimi 10 anni (Tabella 1).

Le mutazioni di *BRAF* si trovano in circa il 50% dei pazienti con melanoma, soprattutto negli individui più giovani ed in quei melanomi che originano sulla cute non esposta cronicamente al sole (5). Nell'ambito delle mutazioni di *BRAF*, il 75% di queste sono rappresentate dalla mutazione V600E, il 19% dalla mutazione V600K, mentre nel restante 6% è racchiusa una varietà di mutazioni come la V600D e la V600R (5).

Il 2010 ha portato novità non solo nel campo dell'immunoterapia del melanoma. Il Vemurafenib (conosciuto anche come PLX4032 o RG7204) ovvero l'inibitore specifico per la forma mutata BRAF V600E rappresenta un'altra importante conquista nel campo della terapia del melanoma e dell'oncologia in generale. Infatti, considerando che il 50% dei pazienti affetti da melanoma possiede la proteina mutata BRAF V600E (che determina un segnale di proliferazione sempre attivo), trovare un agente che potesse inibire l'attività di questa chinasi avrebbe potuto rappresentare l'inizio di una nuova era per il trattamento del melanoma. Per anni, il Sorafenib, un inibitore multi-chinasico non selettivo, aveva acceso le speranze di una svolta nel trattamento del melanoma.

Lo studio di fase I/II, riportato da Flaherty et al., mostrava una progressione libera da malattia (PFS) di 8,8 mesi, quando

somministrato in combinazione con il Carboplatino ed il Paclitaxel (6,7), rispetto al dato "storico" di 1,7 mesi (1). Purtroppo, gli studi successivi di fase II-III (8-10) non hanno confermato il dato iniziale dello studio di Flaherty. Tuttavia, considerando lo studio pubblicato qualche mese fa con Vemurafenib (11), l'idea originale del *targeting* di BRAF non era sbagliata.

Il Vemurafenib ha mostrato risposte obiettive nel melanoma avanzato del 50-80%, anche se di durata mediana di 6-7 mesi (12,13).

Nello studio randomizzato di fase III (BRIM-3) (11), dove il trattamento con Vemurafenib veniva comparato al trattamento *standard* con Dacarbazina (DTIC), al momento della prima *interim analysis* è stato evidenziato un impatto statisticamente significativo del trattamento con Vemurafenib sia sulla PFS sia sulla sopravvivenza totale (OS). Per tale motivo, il Comitato indipendente per il monitoraggio dei dati (IDMC) ha autorizzato il *crossover* per i pazienti nel braccio di trattamento con DTIC. In particolare, la PFS mediana nel braccio Vemurafenib era significativamente più lunga rispetto a quella del braccio DTIC: 5,3 verso 1,6 mesi, rispettivamente (HR 0,26, 95% CI: 0,20-0,33 , $p<0,001$) (Figura 1A). A 6 mesi, la sopravvivenza complessiva è stata dell'84% (95% CI: 78-89) nel gruppo Vemurafenib e del 64% (95% CI: 56-73) nel gruppo DTIC. La sopravvivenza mediana sembra essere significativamente migliorata di circa 2,5 mesi, ma i dati non sono ancora maturi per una valutazione definitiva (Figura 1B).

Figura 1A Progressione libera da malattia: studio BRIM-3 (11)

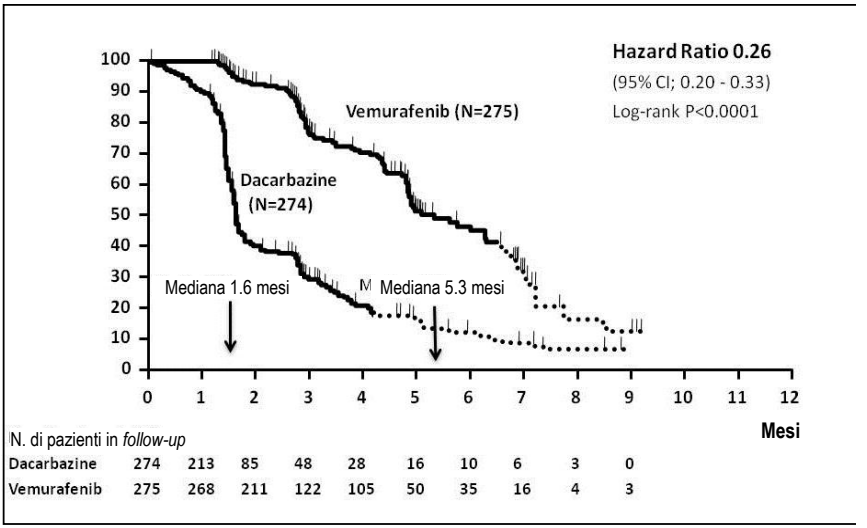
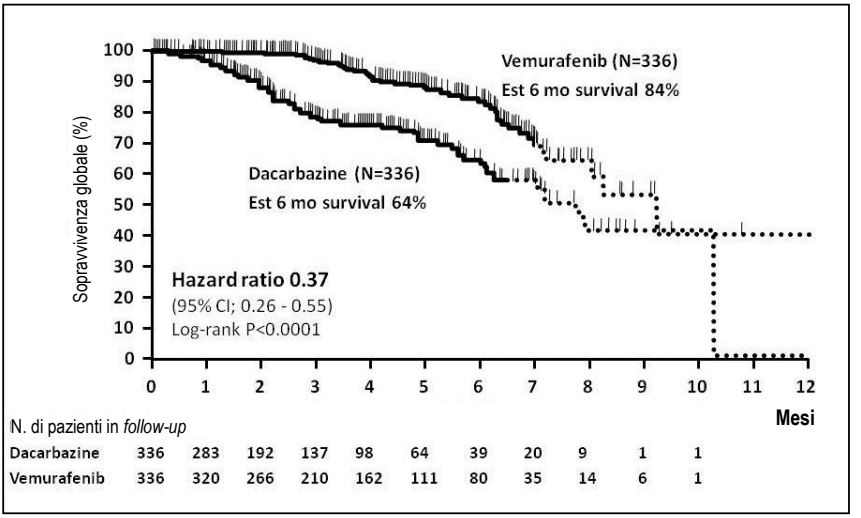


Figura 1B Sopravvivenza totale (OS): studio BRIM-3 (11)



I tassi di risposta erano significativamente migliori nel gruppo Vemurafenib (48%) rispetto al braccio DTIC (5%) ($p<0,001$). E' da notare che dall'analisi retrospettiva è emerso che 10 pazienti avevano la mutazione BRAF V600K.
Le tossicità più comuni del Vemurafenib sono state artralgie, *rash*, fotosensibilità, astenia, alopecia, prurito e papilloma cutaneo. Le manifestazioni cutanee sono importanti, perché la tossicità totale cutanea, comprendente carcinoma squamocellulare/cheratoacantoma è stata riscontrata nel 26% dei pazienti (14).
Attualmente, sono in fase di sperimentazione altri due inibitori di BRAF, il GSK2118436 ed il RAF265.
Kefford et al. (15) hanno riportato tassi di risposta in circa il 60% dei pazienti con melanoma trattati con GSK2118436, in uno studio che comprendeva sia pazienti con la mutazione BRAF V600E sia pazienti con la mutazione BRAF V600K. Gli effetti collaterali sono stati molto simili a quanto è stato osservato con Vemurafenib. Inoltre, lo stesso gruppo di ricercatori ha dimostrato un'eccellente attività del GSK2118436 nei confronti dei pazienti con metastasi cerebrali (16). Un ampio studio di fase II è attualmente in corso per confermare i risultati iniziali. Inoltre, è in corso anche uno studio di fase III di confronto tra l'attività del GSK2118436 con quella di DTIC su un piccolo campione (200 casi) e come *end-point* primario la PFS, poiché lo studio consente il *crossover*.
RAF265 è un piccolo inibitore molecolare di BRAF V600E e di VEGFR2, che ha evidenziato un'inibizione dose-dipendente della crescita tumorale e della regressione tumorale in xenotrapianti con cellule mutanti in BRAFV600E. La prima esperienza clinica è stata riportata nel 2011. In uno studio di fase I su 71 pazienti valutabili, i tassi di risposta sono stati deludenti: 16% in pazienti con mutazione BRAF e 13% nei pazienti BRAF WT (17).
Esiste una chiara evidenza che l'uso degli inibitori di BRAF porta alla riattivazione del *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPK) *pathway* e migliora la crescita mediata da CRAF (18-22). Questo suggerisce che la combinazione degli inibitori di BRAF con gli inibitori di MEK possa essere la combinazione ottimale per prolungare la PFS e ridurre l'incidenza di carcinoma a cellule squamose.

Inibitori di MEK
MEK è un bersaglio molecolare inserito nell'ambito del MAPK *pathway* ed è immediatamente a valle di BRAF. Su modelli

sperimentali cellulari, il trattamento con inibitori di MEK risulta efficace sia sulle linee mutate in *BRAF* sia in quelle mutate in *NRAS*. La frequenza delle mutazioni in *NRAS* è di circa il 20% (la mutazione più frequente è la Q61R) (23). Sembrerebbe, tra l'altro, che le mutazioni in *NRAS* siano associate a melanomi con decorso clinico più aggressivo (24). È stato ipotizzato che l'inibizione contemporanea dei MAPK e PI3K *pathway* possa contrastare l'effetto della mutazione di NRAS (25).
Attualmente, sono in fase di sviluppo per il trattamento del melanoma diversi farmaci che inibiscono MEK (Tabella 1). Tuttavia, un esteso studio randomizzato di fase II di confronto tra l'inibitore di MEK AZD6244 e Temozolomide non ha mostrato alcun beneficio in termini di tassi di risposta o di impatto sulla PFS (26).
Contrariamente al composto suindicato, il GSK1120212 sembrerebbe essere più promettente, con tassi di risposta di circa il 40% (27). Inoltre, è in corso di valutazione la combinazione con l'inibitore di BRAF GSK2118436, con l'aspettativa che la combinazione possa avere effetti additivi o sinergici evitando la stimolazione di CRAF del percorso MEK, quando gli inibitori di BRAF sono utilizzati come agenti singoli, che possono essere la ragione per l'induzione di carcinomi a cellule squamose del tipo cheratoacantoma.
Attualmente, sono in fase di studio altri inibitori di MEK quali il PDO325901, il CMEK162, l'AS703026 (28), l'E6201 (29) ed il GDC0973.
Un capitolo a parte meriterebbe il melanoma uveale. Infatti, esso manca delle mutazioni in *c-KIT*, *NRAS* e *BRAF*, ma presenta unicamente mutazioni attivanti nella subunità alfa di una *G protein* della famiglia GQ: la GNAQ. Nel melanoma, l'attivazione di GNAQ comporta un'attivazione del MAPK *pathway* (30). E' stato dimostrato che linee cellulari di melanoma mutate in GNAQ sono sensibili all'inibizione MEK.

Inibitori di c-KIT
Nel caso di melanomi delle mucose, delle estremità (acrali) e delle aree esposte cronicamente al sole (lentigginosi), è stata dimostrata la presenza di mutazioni del gene *c-KIT*, che predispongono alla risposta al trattamento con c-KIT inibitori (Imatinib, Nilotinib) (Tabella 1).
Le mutazioni di *c-KIT* probabilmente si verificano nell'1% dei melanomi osservati in Nord America, Europa e Australia. Le più importanti

mutazioni sono quelle a livello dell'esone 11 (L576P), dell'esone 13 (K642E, K642X, V654A) e dell'esone 17 (Y822D, Y823D).
Mutazioni attivanti e/o amplificazione del gene *c-KIT* sono stati trovate nel 39% dei melanomi delle mucose, nel 36% dei melanomi acrali e nel 28% dei melanomi che insorgono su cute esposta cronicamente al sole (31). I melanomi delle mucose e delle estremità rappresentano meno del 20% di tutti i melanomi nel mondo occidentale, ma oltre il 70% dei melanomi osservati in Asia (32). Anche se in numero limitato fino ad ora, diverse esperienze cliniche confermano c-KIT come bersaglio terapeutico per il melanoma, con pazienti che hanno ottenuto risposte al trattamento drammatiche e durevoli (33). Un interessante studio cinese di fase II ha riportato tassi di risposta del 20-30% ed il prolungamento della sopravvivenza libera da progressione con il trattamento con Imatinib (34).
Attualmente, sono in corso uno studio di fase II con Nilotinib ed uno randomizzato di fase III di confronto tra Nilotinib e DTIC su un campione di 120 pazienti, con PFS come *end-point* primario.

Tabella 1 Inibitori specifici di proteine dei più importanti *pathway* di trasduzione del segnale (mutate e non)

Target	*Farmaco*	*Fase di studio*
BRAF		
Non Selettivo	Sorafenib	Fase II (8), III (9,10) negativo
	RAF-265	Fase I (17)
Selettivo	XL281	Fase I (36)
	Vemurafenib (Zelboraf©)	Fase I (12), II (13), III positivo (11)
	GSK2118436	Fase I, II (15), III in corso
MEK	AZD6244	Fase II (26)
	GSK1120212	Fase I, II (27), III in corso
	PDO325901	Fase I
	AS703026	Fase I (28)
	E6201	Fase I (29)
	CMEK162	Fase I, II
	GDC0973	Fase I

segue

NRAS	R115777	Fase II
	CMEK162	Fase I, II
PI3K	GDC0941	Fase I
	XL147	Fase I
AKT	MK-2206	Fase I
	GSK690693	Fase I
GNAC e GNA11 *(melanoma uveale)*	MEK inibitori	
c-KIT	Dasatinib*	Fase II negativo (37)
	Imatinib	Fase II positivo (32-34)
	Nilotinib	Fase III in corso
	Masitinib	Fase III in corso

* utilizzato in tutti i pazienti, anche quelli senza mutazione

In conclusione, confrontando i vari *pathway* coinvolti nella progressione del melanoma ad un circuito elettrico complesso, è altamente improbabile che un singolo interruttore sia sufficiente nel determinare la progressione tumorale. È invece molto più probabile che interruttori diversi possano costitutivamente attivare processi differenti e complessi, che contribuiscono alle differenti caratteristiche delle cellule maligne (sopravvivenza, angiogenesi, immortalizzazione, segnale di indipendenza della crescita, blocco dell'apoptosi, potenziale metastatico, ecc.).
Per tale motivo, le combinazioni di farmaci differenti che agiscono a livello dei diversi *pathway* rappresentano il futuro della terapia del melanoma. Il melanoma potrebbe diventare l'esempio da imitare nella terapia del cancro (35). La combinazione di inibitori di BRAF e di MEK rappresenta l'inizio di questa strategia. Sicuramente altri inibitori molecolari in via di sviluppo, quali quelli di ERK, PI3K e AKT contribuiranno a "by-passare" i meccanismi di resistenza ed a potenziare l'efficacia degli agenti *target*.

BIBLIOGRAFIA

1. Korn EL, Liu PY, Lee SJ, Chapman JA, Niedzwiecki D, Suman VJ, Moon J, Sondak VK, Atkins MB, Eisenhauer EA, Parulekar W, Markovic SN, Saxman S, Kirkwood JM. Meta-analysis of phase II cooperative group trials in metastatic stage IV melanoma to determine progression-free and overall survival benchmarks for future phase II trials. *J Clin Oncol 2008 Feb 1; 26(4):527-34*
2. Jansen B, Wacheck V, Heere-Ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T, Hoermann M, Hollenstein U, Wolff K, Pehamberger H. Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet 2000 Nov 18; 356(9243):1728-33*
3. Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U, Pavlick AC, De Conti R, Hersh EM, Hersey P, Kirkwood JM, Haluska FG; Oblimersen Melanoma Study Group. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol 2006 10; 24:4738-45*
4. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med 2005 Nov 17; 353(20):2135-47*
5. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, Ono T, Albertson DG, Pinkel D, Bastian BC. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst 2003 Dec 17; 95(24):1878-90*
6. Flaherty KT, Brose M, Schuchter L, Tuveson D, Lee R, Schwartz B, Lathia C, Weber B, O'Dwyer P. Phase I/II trial of BAY 43-9006, carboplatin (C) and paclitaxel (P) demonstrates preliminary antitumor activity in the expansion cohort of patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology, 2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 22, No 14S (July 15 Supplement), 2004:7507*
7. Flaherty KT, Schiller J, Schuchter LM, Liu G, Tuveson DA, Redlinger M, Lathia C, Xia C, Petrenciuc O, Hingorani SR, Jacobetz MA, Van Belle PA, Elder D, Brose MS, Weber BL, Albertini MR, O'Dwyer PJ. A phase I trial of the oral, multikinase inhibitor sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel. *Clin Cancer Res 2008 Aug 1; 14(15):4836-42*
8. McDermott DF, Sosman JA, Gonzalez R, Hodi FS, Linette GP, Richards J, Jakub JW, Beeram M, Tarantolo S, Agarwala S, Frenette G, Puzanov I, Cranmer L, Lewis K, Kirkwood J, White JM, Xia C, Patel K, Hersh E. Double-blind randomized phase II study of the combination of sorafenib and dacarbazine in patients with advanced melanoma: a report from the 11715 Study Group. *J Clin Oncol 2008; 26:2178-85*

9. Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U, Hogg D, Robert C, Hersey P, Eggermont A, Grabbe S, Gonzalez R, Gille J, Peschel C, Schadendorf D, Garbe C, O'Day S, Daud A, White JM, Xia C, Patel K, Kirkwood JM, Keilholz U. Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J Clin Oncol 2009 Jun 10; 27(17):2823-30*
10. Phase III Trial of Nexavar® in Chemotherapy-Naive Patients with Advanced Melanoma Does Not Meet Primary Endpoint. Study stopped based on interim analysis. 2009-04-27. *http://www.viva.vita.bayerhealthcare.com/index.php?id=36&no_cache=1&tx_ttnews[tt_news]=13136*
11. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur AG; BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med 2011 Jun 30; 364(26):2507-16*
12. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med 2010 Aug 26; 363(9):809-19*
13. Ribas A, Kim KB, Schuchter LM, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Flaherty KT, Moschos SJ, Lawrence DP, Hersey P, Kefford RF, Chmielowski B, Puzanov I, Li J, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK, Sosman JA. BRIM-2: An open-label, multicenter phase II study of vemurafenib in previously treated patients with BRAF V600E mutation-positive metastatic melanoma. *J Clin Oncol 2011; 29 (suppl):abstr 8509*
14. McArthur G, Hauschild A, Robert C, Flaherty KT, Haanen JB, Ascierto P, Nelson B, Lee RJ, Nolop K, Chapman PB. Vemurafenib improves overall survival compared to dacarbazine in advanced BRAFV600E-mutated melanoma: Updated survival results from a Phase III randomised, open-label, multicentre trial. *Eur J Cancer 2011; 47 (suppl 2):abstr 28 LBA*
15. Kefford R, Arkenau H, Brown MP, Millward M, Infante JR, Long GV, Ouellet D, Curtis M, Lebowitz PF, Falchook GS. Phase I/II study of GSK2118436, a selective inhibitor of oncogenic mutant BRAF kinase, in patients with metastatic melanoma and other solid tumors. *J Clin Oncol 2010; 28:15s(suppl): abstr 8503*
16. Long GV, Kefford RF, Carr PJA, Brown MP, Curtis M, Ma B, Lebowitz P, Kim KB, Kurzrock R, Flachook G. Phase 1/2 study of GSK2118436, a selective inhibitor of V600 mutant (Mut)BRAF kinase: evidence of

activity in melanoma brain metastases (mets). *Annals Oncol 2010; 21 (suppl 8): abstr viii 12*
17. Sharfman WH, Hodi FS, Lawrence DP, Flaherty KT, Amaravadi RK, Kim KB, Dummer R, Gobbi S, Puzanov I, Sosman JA, Dohoney K, Lam LP, Kakar S, Tang Z, Krieter O, Atkins MB. Results from the first-in-human (FIH) phase I study of the oral RAF inhibitor RAF265 administered daily to patients with advanced cutaneous melanoma. *J Clin Oncol 2011; 29 (suppl): abstr 8508*
18. Robert C, Arnault JP, Mateus C. RAF inhibition and induction of cutaneous squamous cell carcinoma. *Curr Opin Oncol 2011; 23(2):177-82*
19. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee MK, Attar N, Sazegar H, Chodon T, Nelson SF, McArthur G, Sosman JA, Ribas A, Lo RS. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature 2010 Dec 16; 468(7326):973-7*
20. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, Ludlam MJ, Stokoe D, Gloor SL, Vigers G, Morales T, Aliagas I, Liu B, Sideris S, Hoeflich KP, Jaiswal BS, Seshagiri S, Koeppen H, Belvin M, Friedman LS, Malek S. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature 2010 Mar 18; 464(7287):431-5*
21. Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, Nourry A, Niculescu-Duvas I, Dhomen N, Hussain J, Reis-Filho JS, Springer CJ, Pritchard C, Marais R. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell 2010 Jan 22; 140(2):209-21*
22. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, Emery CM, Stransky N, Cogdill AP, Barretina J, Caponigro G, Hieronymus H, Murray RR, Salehi-Ashtiani K, Hill DE, Vidal M, Zhao JJ, Yang X, Alkan O, Kim S, Harris JL, Wilson CJ, Myer VE, Finan PM, Root DE, Roberts TM, Golub T, Flaherty KT, Dummer R, Weber BL, Sellers WR, Schlegel R, Wargo JA, Hahn WC, Garraway LA. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature 2010 Dec 16; 468(7326):968-72*
23. Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol 2006 Jan; 126(1):154-60*
24. Jakob JA, Bassett RL, Ng CS, Lazar AJF, Alvarado GC, Rohlfs ML, Richard J, Gershenwald JE, Hwu P, Kim KB, Davies MA. Clinical characteristics and outcomes associated with BRAF and NRAS mutations in metastatic melanoma. *J Clin Oncol 2011; 29 (suppl): abstr 8500*
25. Jaiswal BS, Janakiraman V, Kljavin NM, Eastham-Anderson J, Cupp JE, Liang Y, Davis DP, Hoeflich KP, Seshagiri S. Combined targeting of BRAF and CRAF or BRAF and PI3K effector pathways is required for efficacy in NRAS mutant tumors. *PLoS One 2009 May 27; 4(5):e5717*

26. Dummer R, Robert C, Chapman PB, Sosman JA, Middleton M, Bastholt L, Kemsley K, Cantarini MV, Morris C, Kirkwood JM. AZD6244 (ARRY-142886) vs temozolomide (TMZ) in patients (pts) with advanced melanoma: an open-label, randomized, multicenter, phase II study. *J Clin Oncol 2008; 26: abstr 9033*
27. Arkenau HT, Kefford R, Long GV. Targeting BRAF for patients with melanoma. *Br J Cancer 2011 Feb 1; 104(3):392-8*
28. Delord J, Houede N, Awada A, Taamma A, Faivre SJ, Besse-Hammer T, Italiano A, Vignaud C, Donica M, Raymond E. First-in-human phase I safety, pharmacokinetic (PK), and pharmacodynamic (PD) analysis of the oral MEK-inhibitor AS703026 (two regimens [R]) in patients (pts) with advanced solid tumors. *J Clin Oncol 2010; 28:15s(suppl): abstr 2504*
29. Borad MJ, Akerele CE, Ramanathan RK, Northfelt DW, Reyderman L, Verbel D, Feit K, Von Hoff DD, Tibes R. Phase I dose-escalation study of E6201, a MEK-1 inhibitor, in advanced solid tumors. *J Clin Oncol 2010; 28:15s(suppl): abstr 2505*
30. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, Simpson EM, Barsh GS, Bastian BC. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature 2009 Jan 29; 457(7229):599-602*
31. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol 2006; 24:4340-6*
32. Kong Y, Si L, Zhu Y, Xu X, Corless CL, Flaherty KT, Li L, Li H, Sheng X, Cui C, Chi Z, Li S, Han M, Mao L, Lu A, Guo J. Large-scale analysis of KIT aberrations in Chinese patients with melanoma. *Clin Cancer Res 2011 Apr 1; 17(7):1684-91*
33. Hodi FS, Friedlander P, Corless CL, Heinrich MC, Mac Rae S, Kruse A, Jagannathan J, Van den Abbeele AD, Velazquez EF, Demetri GD, Fisher DE. Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma. *J Clin Oncol 2008 Apr 20; 26(12):2046-51*
34. Guo J, Si L, Kong Y, Flaherty KT, Xu X, Zhu Y, Corless CL, Li L, Li H, Sheng X, Cui C, Chi Z, Li S, Han M, Mao L, Lin X, Du N, Zhang X, Li J, Wang B, Qin S. Phase II, Open-Label, Single-Arm Trial of Imatinib Mesylate in Patients With Metastatic Melanoma Harboring c-Kit Mutation or Amplification. *J Clin Oncol 2011 Jul 20; 29(21):2904-9*
35. Ascierto PA, Streicher HZ, Sznol M. Melanoma: a model for testing new agents in combination therapies. *J Transl Med 2010 Apr 20; 8:38*
36. Schwartz GK, Robertson S, Shen A, Wang E, Pace L, Dials H, Mendelson D, Shannon P, Gordon M. A phase I study of XL281, a selective oral RAF kinase inhibitor, in patients (Pts) with advanced solid tumors. *J Clin Oncol 2009; 27:15s (suppl) abstr 3513*
37. Kluger HM, Dudek AZ, McCann C, Ritacco J, Southard N, Jilaveanu LB, Molinaro A, Sznol M. A phase 2 trial of dasatinib in advanced melanoma. *Cancer 2011 May 15; 117(10):2202-8*

12.0 TRATTAMENTO RADIANTE

12.1 Radioterapia
12.2 Ipertermia nel trattamento del melanoma cutaneo

12.1 Radioterapia

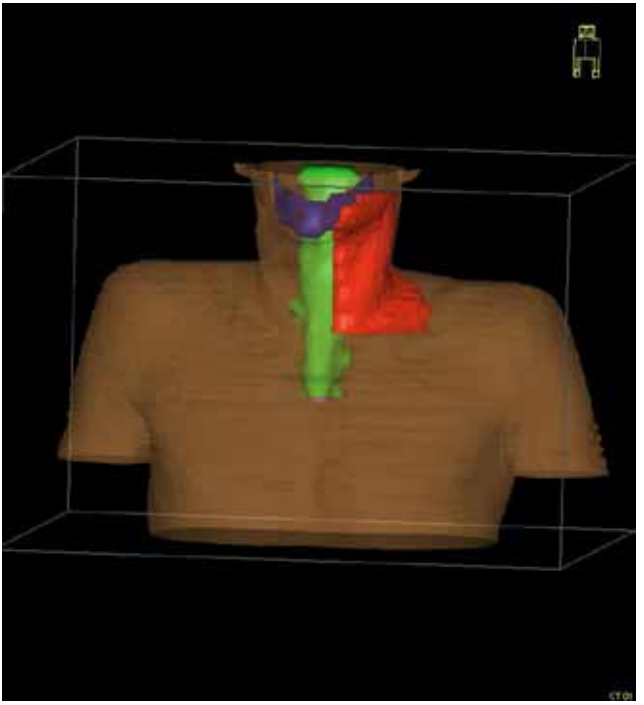
Il melanoma viene generalmente giudicato un tumore radioresistente. Studi clinici retrospettivi indicano che solo il 40% dei focolai irradiati con tecnica convenzionale è responsivo; negli altri casi, la mancata risposta può essere spiegata con la presenza di frazioni cellulari ipossiche e di cloni cellulari con spiccata capacità di riparo (1).
Esperienze *in vitro* su culture di cellule melanomatose hanno mostrato infatti la grande capacità di tali cellule di riparare il danno subletale da radiazioni (2). La radioresponsività del melanoma varia comunque da caso a caso e non è prevedibile a priori.
Il problema centrale della radioterapia del melanoma è quello della dose ottimale, singola e totale.
Gli insuccessi della radioterapia dipenderebbero in parte dal fatto che è necessaria una dose singola elevata per ottenere un consistente effetto tumoricida nei confronti della neoplasia (fenomeno questo legato all'esistenza di una larga "spalla" nella curva di sopravvivenza delle cellule di melanoma irradiate).
Per questo motivo radiobiologico, i più recenti protocolli di trattamento radioterapico prevedono dosi singole tra 5-9 Gy. L'entità della dose totale sembra essere meno rilevante rispetto all'entità della dose singola; la dose totale varia a seconda del tipo di frazionamento. Il frazionamento più in uso negli ultimi anni è stato quello di 6 Gy x 2 volte alla settimana fino ad una dose totale di 36-42 Gy (3).
Overgaard (4) ha proposto 9 Gy x 3 sedute distanziate di 96 ore una dall'altra, fino ad una dose totale di 27 Gy in 8 giorni; questo schema, oltre a produrre più del 90% di risposte (complete e parziali), ha il vantaggio della breve durata della radioterapia.
Bentzen (3) propone una valutazione clinica per monitorare il risultato della radioterapia. E' stato analizzato il TCP (*Tumor-Control Probability*) su 239 lesioni radiotrattate. Si è visto che il *treatment time* non influisce sul TCP; la dose per singola frazione influenza

il TCP (6 Gy sono considerati ideali) e le dimensioni del tumore influenzano il TCP.
Il trattamento radiante vede come indicazioni:

a) Trattamento del tumore primitivo e dei linfonodi regionali metastatici

Seguendo i principi sopra esposti, la radioterapia potrebbe affiancarsi utilmente alla chirurgia nei casi di exeresi non sicuramente radicale di estesi melanomi, il che può verificarsi quando la sede del tumore non consenta eccessive demolizioni per ragioni estetiche (capo o collo).
Ang (5) afferma che la radioterapia può intervenire efficacemente come trattamento complementare alla chirurgia anche a livello di stazioni linfonodali, quando vi siano dubbi sulla radicalità dell'intervento. La dose è 6-9 Gy per seduta sino a 30-50 Gy (Figura 1).

Figura 1 Tipico campo di irradiazione dei linfonodi del collo



Corry (6) ha descritto il trattamento di 42 pazienti trattati con radioterapia 50-60 Gy, in 25-30 frazioni, dopo asportazione dei linfonodi metastatici senza segni macroscopici di malattia ed ha osservato che il 26% di pazienti era libero da malattia a 5 anni, il 20% era recidivato, il 52% presentava metastasi a distanza ed il 2% recidiva + metastasi a distanza. L'Autore raccomanda la radioterapia post-operatoria nei casi ad alto rischio: metastasi linfonodali multiple, diffusione extracapsulare o recidive linfonodali.
Strom (7) descrive il trattamento radiante, in 26 pazienti, con 30 Gy in 5 frazioni dopo linfoadenectomia ascellare e sovraclaveare per metastasi linfonodali per melanoma. La sopravvivenza a 5 anni è stata del 50,1%, con una netta riduzione delle recidive nei pazienti senza residui macroscopici (1 su 21).
Fuhrmann (8) confronta 2 casistiche di 2 Centri diversi; in una è stato utilizzato il trattamento con radioterapia adiuvante e nell'altra quello con sola chirurgia. La curva di sopravvivenza è stata similare nei 2 gruppi e le recidive locali di poco inferiori nel gruppo radiotrattato. La radioterapia adiuvante riduce l'incidenza di recidive loco-regionali, ma non sposta la curva di sopravvivenza per l'alta incidenza di metastasi a distanza.
Bonnen (9) ha evidenziato che la radioterapia aiuterebbe a contenere la diffusione del melanoma alla testa, evitando l'invasione dei linfonodi del collo e, per alcune tipologie di pazienti, il ricorso all'asportazione totale dei linfonodi. Sono stati esaminati 157 pazienti con melanoma al collo ed alla testa, che hanno seguito un programma di radioterapia in seguito ad intervento mirato all'asportazione del tumore primario tra il 1983 ed il 1998: 15 pazienti hanno avuto recidive in linfonodi adiacenti, cioè un numero inferiore rispetto a quanto avviene solitamente in seguito al solo intervento chirurgico e 57 pazienti hanno avuto ricadute in altre zone del corpo. I pazienti dello studio presentavano melanoma di I o II stadio. A 10 anni dall'intervento, l'89% non ha presentato recidive in linfonodi vicini al tumore iniziale. "La radioterapia può effettivamente controllare la diffusione del melanoma se utilizzata appropriatamente", ha commentato l'Autore dello studio, ricercatore presso l'*M.D. Anderson Cancer Center* di Houston. In particolare, si sottolinea che la radioterapia può essere particolarmente indicata per pazienti che non possono sottoporsi alla rimozione estesa dei linfonodi o che non possono sopportare la chemioterapia, come per esempio gli anziani.

Ballo (10) documenta un controllo della malattia localmente dell'87% con l'irradiazione dei linfonodi ascellari dopo linfadenectomia utilizzando l'ipofrazionamento della dose.
La radioterapia trova indicazione soprattutto nel trattamento di lesioni secondarie; in particolare, metastasi cutanee non asportabili chirurgicamente per fissità o per sede, metastasi linfonodali fisse, metastasi ossee e metastasi cerebrali.

b) Trattamento di recidive locali o metastatiche non asportabili chirurgicamente

Le dosi singole devono essere dell'ordine di 6-9 Gy per seduta, sino a 30-50 Gy.
Occasionalmente, la terapia radiante può aiutare a controllare metastasi *in transit*, estese ed inoperabili, localizzate tra il melanoma primario ed il distretto linfonodale regionale. L'irraggiamento post-operatorio è consigliabile anche a seguito di riasportazione di metastasi *in transit*. L'esperienza presso lo IOV di Padova è stata di 15 pazienti portatori di recidive locali trattati in associazione con immunoterapia (INF), in un altro caso l'associazione è stata con vaccinoterapia. Le dosi di radioterapia sono state 50 Gy in 25 frazioni / 30 Gy in 10 frazioni, più raramente 15/20 Gy in 3/4 frazioni. Il risultato nel controllo locale della malattia è stato ottimo (Figura 2) (11-13).

Figura 2 Radioterapia in associazione ad immunoterapia di recidiva locale di melanoma



c) Trattamento delle metastasi

In caso di metastasi ossee sembrano sufficienti dosi singole di 4 Gy, in quanto dosi singole più elevate non conseguono risultati migliori; la dose totale deve superare i 30 Gy.

L'incidenza delle metastasi al Sistema Nervoso Centrale da melanoma è, secondo i vari Autori, tra il 30% ed il 40% dei casi. Da una ricerca condotta da Amer (14), l'incidenza delle metastasi in fase clinica iniziale della malattia si attesta al 13%, per progredire al 45% nel corso della malattia, sino al 75% in ambito autoptico.

La tendenza è confermata dallo studio di Choi (15), che ha dimostrato l'incidenza delle metastasi cerebrali nel tempo di pazienti portatori di melanoma; hanno metastasi cerebrali nel 18% dei casi entro il primo anno e nel 50% a 2 anni e mezzo, sino alla totalità dei casi a 14 anni.

Anche per le metastasi cerebrali deve essere seguito lo stesso criterio di dosi singole elevate, per conseguire un risultato utile.

In considerazione dello scopo prevalentemente palliativo della terapia, in questi casi sono stati preferiti trattamenti concentrati nel tempo, con dosi singole di 4-6 Gy 2-3 volte alla settimana, fino ad una dose totale di 20-30 Gy. Un altro schema già collaudato prevede 4 Gy per 5 sedute in giorni consecutivi.

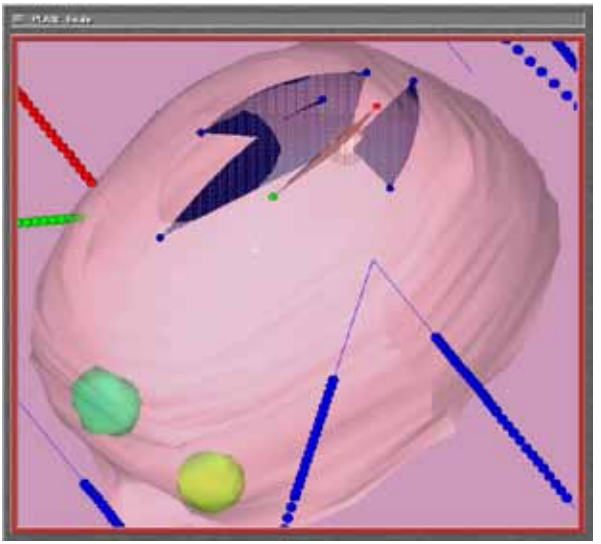
Di solito, la radioterapia viene associata alla terapia con corticosteroidi ed eventualmente con anticonvulsivanti. La Conferenza di Londra sul trattamento delle metastasi cerebrali nel 1999 ha definito i fattori prognostici (dimensioni, numero delle lesioni, *performance status* ed età del paziente) e si è deciso che la chirurgia è indicata nelle localizzazioni singole, in pazienti in buone condizioni generali e sintomatici, la radioterapia su tutto l'encefalo in pazienti con più di 4 localizzazioni e la radioterapia stereotassica su quelli con un numero inferiore di lesioni. La radioterapia è esclusa nei pazienti a basso *performance status*.

Il trattamento radiante tradizionale consiste nell'irradiazione totale dell'encefalo con l'intento palliativo sintomatico, specie nelle metastasi multiple. Una buona palliazione si può ottenere con dosi di 30 Gy in 10 frazioni in 2 settimane, con un discreto costo-beneficio per il paziente. Il multifrazionamento giornaliero non ha migliorato la risposta palliativa.

Quello che emerge con il trattamento tradizionale nelle localizzazioni multiple è che la risposta sintomatica sposta di poco la sopravvivenza e l'unica osservazione comune è una variazione della sopravvivenza

nel caso della localizzazione unica senza altra diffusione metastatica, specie se asportata od irradiata con stereotassi.
La stereotassi è una tecnica recente e complessa che, se singola, viene chiamata radiochirurgia e, se ripetuta, è definita frazionata. La successione della procedura implica uno studio dosimetrico accurato con elaborazione delle immagini anche tridimensionale e, nel caso della radiochirurgia, con il posizionamento di un casco speciale che permette un'irradiazione precisa in volumi limitati. Nel caso della tecnica frazionata, il casco è applicato al cranio, ma ripetibile senza traumi ed idonea per la radioterapia pediatrica.
La stereotassi chirurgica ha lo stesso risultato in relazione alla sopravvivenza raggiunta con la chirurgia di asportazione, con una notevole differenza di costi e, soprattutto, di impegno anestesiologico e post-chirurgico per il paziente (16-20).
Alcuni Autori inoltre hanno identificato nel melanoma l'istotipo più responsivo alla radiochirurgia, come controllo locale della metastasi.
Discussa è l'associazione alla stereotassi dell'irradiazione a campi estesi, che secondo alcuni Autori migliora significativamente la sopravvivenza (Figura 3).

Figura 3 Ricostruzione tridimensionale di un trattamento stereotassico



12.2 Ipertermia nel trattamento del melanoma cutaneo

Il calore è stato usato nel trattamento del cancro fin dall'inizio del secolo attuale. E' stato dimostrato come l'effetto letale del calore sia maggiore per la cellula tumorale rispetto a quella sana.
La sopravvivenza cellulare è stata studiata a varie temperature comprese tra 37° e 50°C.
L'effetto del calore sulle cellule maligne, *in vitro*, è minimo finché non vengono raggiunte temperature intorno a 43°C.
L'effetto letale non viene raggiunto da una specifica temperatura, ma è necessario piuttosto un determinato *quantum* di calore per produrre l'inattivazione cellulare; l'aumento di temperatura deve peraltro essere mantenuto per periodi abbastanza lunghi (2 ore o più): numerosi sono i meccanismi d'azione del calore considerati. Di unanime rilievo è l'inibizione della glicolisi aerobica ed anaerobica, ma il decremento del consumo d'ossigeno è considerato un fenomeno tardivo.
Diversi Autori hanno osservato una ridotta sintesi di proteine e di acidi nucleici. E' opinione di molti che una lesione del DNA possa rappresentare il danno da calore più significativo. Si fa l'ipotesi che il calore possa inattivare le endonucleasi necessarie alla riparazione del DNA, più specificamente nella cellula neoplastica che in quella normale.
Altri Autori danno particolare importanza alla lesione della membrana cellulare. Il calore altera, secondo le loro osservazioni, l'ambiente intracellulare provocando la fuoriuscita di poliammine. Queste molecole policationiche, oltre ad essere dei regolatori del ciclo cellulare, influenzano la permeabilità della membrana.
L'aumentata fluidità si traduce nella perdita della sua normale funzione osmoregolatrice, che è essenziale allo stato di idratazione della cellula. L'aumento della produzione di energia, necessaria a ricostituire la normale composizione lipidica della membrana, in ambiente già relativamente ipossico comporta una rapida depressione della respirazione che, abbassando il pH, rende la cellula più vulnerabile al danno termico.
Un'altra importante condizione contribuisce a determinare l'effetto discriminante del calore tra cellula neoplastica e cellula normale: l'anomalia della circolazione tumorale.
Mentre il tessuto sano può disperdere calore perché i suoi vasi, sensibili all'effetto termico, sono in grado di dilatarsi, aumentare

il flusso ematico e mantenere l'omeostasi termica, la stessa cosa non avviene per il tessuto tumorale, irrorato da capillari interni neoformati, insensibili ai normali meccanismi di neuroregolazione, che contraggono poche anastomosi periferiche con i capillari sani e presentano pertanto un'elevatissima resistenza al flusso. Questa resistenza viene ulteriormente accentuata da fenomeni di compressione capillare, dovuti alla massa che si espande ed alla presenza di trombi cellulari neoplastici intracapillari. La conseguenza è che, a parità di energia termica somministrata, il tessuto tumorale raggiunge temperature superiori a quelle del tessuto sano. La vascolarizzazione tumorale può essere significativamente danneggiata quando viene sottoposta a determinate temperature che alterano, ma non danneggiano, in modo decisivo, la vascolarizzazione dei tessuti normali.
Sottoposto a calore, l'ambiente intra-tumorale diviene acido, ipossico e malnutrito. Una tale condizione sub-ottimale potenzia la risposta delle cellule neoplastiche all'ipertermia, inibisce la riparazione del danno termico ed interferisce con lo sviluppo della cosiddetta tolleranza termica. L'ambiente acido potenzia la suscettibilità delle cellule tumorali a determinati farmaci somministrati ad alte temperature.
Le modificazioni dell'ossigenazione dei tessuti neoplastici e normali hanno inoltre significative implicazioni sull'efficacia dell'utilizzazione in differenti sequenze di tecniche combinate, quali l'ipertermia e la radioterapia.
Gli scarsi risultati oncolitici sono la risultanza da un lato delle limitazioni al loro impiego, legate agli effetti tossici, e dall'altro della resistenza all'azione di farmaci citotossici della frazione cellulare ipossica non proliferante: tale condizione, infatti, causata dell'insufficiente vascolarizzazione centrale del tumore, che già come tale determina una scarsa concentrazione del farmaco citolitico per inadeguata perfusione sanguigna, compromette i meccanismi di trasporto attivo attraverso le membrane cellulari mediati dalla presenza di ossigeno.
Le cellule ipossiche, inoltre, sono circa 3 volte più resistenti alla terapia radiante, rispetto alla popolazione cellulare in ambiente biologico con sufficiente pO_2.
Sulla base di tali considerazioni, l'impiego dell'ipertermia può rivestire un ruolo di rilevante importanza nell'ambito dei trattamenti terapeutici anti-neoplastici. L'insufficiente vascolarizzazione centrale della massa neoplastica, sia in termini anatomici sia funzionali,

impedisce al tessuto cellulare neoplastico, riscaldato mediante le varie metodiche di ipertermia, di rimuovere rapidamente il calore.
Quest'ultimo, persistendo a lungo all'interno della massa neoplastica, determina modificazioni citologiche che si traducono in un graduale effetto citotossico, prevalente sulla popolazione cellulare ipossica.
L'impiego dell'ipertermia appare inoltre privo degli effetti collaterali propri degli altri trattamenti terapeutici: non interferisce negativamente sul sistema immunocompetente (anzi, talora lo esalta, mettendo verosimilmente in atto un meccanismo di evidenziazione di antigeni tumorali non rilevabili in condizioni normali), non altera la crasi ematica e non determina effetti tossici sugli altri organi od apparati.
L'impiego esclusivo dell'ipertermia appare oggi circoscritto alla cura dei tumori non altrimenti trattabili o di quelli in fase avanzata ampiamente pre-trattati con altre metodiche. Più promettente appare l'impiego dell'ipertermia con tecnica a radiofrequenza associata a chemioterapia od a radioterapia.
Studi già effettuati, pur non chiarendo completamente il meccanismo di un'eventuale sinergismo termoterapia-farmaci antiblastici, hanno dimostrato un reale potenziamento dell'attività oncolitica di alcune sostanze terapeutiche (21-23).
Il razionale di un'associazione radioterapia-ipertermia si basa sulla considerazione che la terapia radiante non è efficace su cellule ipossiche non proliferanti. L'effetto citotossico delle radiazioni si esplica sul tessuto tumorale ben irrorato e ben ossigenato, lasciando inalterata la popolazione cellulare ipossica. Le cellule ipossiche, in fase di sintesi del DNA, in condizioni microambientali di pH acido, sono al contrario termosensibili. Il calore, inoltre, ostacola i processi di riparazione cellulare innescati dall'effetto della terapia radiante, comportandosi nei confronti di questa come radiosensibilizzante.
Gli obiettivi dell'associazione radioterapia-ipertermia sono da un lato ottenere un guadagno terapeutico nei confronti della sola radioterapia, impiegando una dose minore di RAD per ottenere lo stesso effetto citoriduttivo e dall'altro ottenere un buon indice terapeutico, esercitando un'azione lesiva nei confronti del tumore, maggiore che sui tessuti sani, sensibili anch'essi al potenziamento reciproco dei due trattamenti.
Il protocollo di associazione più efficace e meno dannoso appare quello che prevede l'impiego della termoterapia in successione al trattamento radiante, con un intervallo di circa 3-4 ore.
Il trattamento ipertermico può essere loco-regionale e generale (sistemico), in rapporto al volume dei tessuti da trattare.

Le tecniche utilizzate per raggiungere l'ipertermia loco-regionale sono le seguenti:

a) ultrasuoni; gli ultrasuoni sono in grado di determinare un adeguato rialzo termico a livello delle lesioni superficiali;
b) radiazioni elettromagnetiche; le radiazioni elettromagnetiche utilizzate per il trattamento ipertermico hanno una frequenza fra 13,56 e 2.450 MHz;
c) perfusione regionale con liquidi riscaldati; questa tecnica utilizza come mezzo di trasporto del calore il sangue circolante di quel distretto, mediante una tecnica di circolazione extracorporea. Nell'ambito della perfusione loco-regionale si possono distinguere due metodiche:
    1- perfusione ipertermica; prevede l'isolamento dei vasi della regione da trattare, che vengono raccordati alla macchina cuore-polmone contenente sangue diluito al 50% con soluzione isotonica iso-osmotica;
    2- perfusione ipertermica antiblastica; si usa la stessa tecnica della semplice perfusione ipertermica. Una volta raggiunta la temperatura di 41,8-42°C, vengono iniettati nella cannula arteriosa i farmaci antineoplastici a dosi refratte.

Storm (24) ha organizzato uno studio multicentrico negli U.S.A., in cui sono stati trattati 1.170 pazienti, negli anni 1977-83, con ipertermia localizzata (radiazioni elettromagnetiche) da sola od in associazione con radioterapia o chemioterapia. I pazienti presentavano tutti neoplasie solide in fase avanzata con recidive o metastasi; la maggior parte dei pazienti era già stata sottoposta, con scarsi risultati, a terapia chirurgica, radioterapia o chemioterapia.
Questa casistica comprendeva 137 pazienti affetti da melanoma cutaneo. I risultati di questa nuova metodica terapeutica evidenziavano nei pazienti con melanoma un 13% di regressioni complete, un 14% di regressioni parziali ed un 4% di regressioni minime; il 23% presentava una sostanziale stabilizzazione della malattia ed il 46% una progressione della malattia.
La risposta al trattamento risultava indipendente dalla localizzazione del tumore, dalla profondità e dalle dimensioni della lesione. La regressione della formazione neoplastica era più frequente con le associazioni di ipertermia-radioterapia e ipertermia-chemioterapia rispetto alla sola ipertermia.

Un significativo numero di regressioni neoplastiche fu osservato quando l'ipertermia veniva associata a radioterapia con dosi inferiori rispetto allo *standard* in pazienti che avevano già ricevuto, senza risultati positivi, la sola radioterapia e quando l'ipertermia veniva associata a chemioterapia, già risultata inefficace in precedenti trattamenti in cui era stata utilizzata da sola.
Il valore dell'ipertermia come terapia adiuvante alla radioterapia nei pazienti con melanoma è stata studiata in uno studio clinico randomizzato europeo (25). Settanta pazienti reclutati con 134 lesioni, metastatiche o ricorrenti, furono sottoposti a radioterapia 8-9 Gy in 3 frazioni in 8 giorni da sola od associata ad ipertermia 43°C per 60 minuti. Si è osservato che la combinazione radioterapia-ipertermia aumenta significatamene il controllo locale della neoplasia rispetto alla sola radioterapia (46% vs 28%, p=0,008).

BIBLIOGRAFIA

1. Peters LJ, Byers RM, Ang KK. Radiotherapy in melanoma. In: Cutaneous Melanoma, 2nd edition. Balch CM, Houghton AN, Milton GW, Sober AJ, Soong SJ (eds) *JB Lippincott Co., Philadelphia, 1992 pag: 509-21*
2. Bentzen SM, Overgaard J, Thames HD et al. Clinical radiobiology of malignant melanoma. *Radiotherapy and Oncology 1989; 16:169-82*
3. Bentzen SM, Thames HD. Tumor volume and local control probability: clinical data and radiobiological interpretations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys 1996 Aug 1; 36(1):247-51*
4. Overgaard J. Radiation treatment of malignant melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys 1980 Jan; 6(1):41-4*
5. Ang KK, Byers RM, Peters LJ et al. Regional radiotherapy as adjuvant treatment for head and neck malignancy melanoma. *Archives of Otolaryngology Head and Neck Surgery 1990; 116:169-72*
6. Corry J, Smith JG, Bishop M, Ainslie J. Nodal radiation therapy for metastatic melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys 1999 Jul 15; 44(5):1065-9*
7. Strom EA, Ross MI. Adjuvant radiation therapy after axillary lymphadenectomy for metastatic melanoma: toxicity and local control. *Ann Surg Oncol 1995 Sep; 2(5):445-9*
8. Fuhrmann D, Lippold A, Borrosch F, Ellwanger U, Garbe C, Suter L. Should adjuvant radiotherapy be recommended following resection

of regional lymph node metastases of malignant melanomas? *Br J Dermatol 2001 Jan; 144(1):66-70*
9. Bonnen MD, Ballo MT, Myers JN et al. Elective radiotherapy provides regional control for patients with cutaneous melanoma of the head and neck. *Cancer 2004; 100(2):383-9*
10. Ballo MT, Strom EA, Zagars GK, Bedikian AY, Prieto VG, Mansfield PF, Lee JE, Gershenwald JE, Ross MI. Adjuvant irradiation for axillary metastases from malignant melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys 2002 Mar 15; 52(4):964-72*
11. Burnette BC, Liang H, Lee Y, Chlewicki L, Khodarev NN, Weichselbaum RR, Fu YX, Auh SL. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type i interferon-dependent innate and adaptive immunity.*Cancer Res 2011 Apr 1; 71(7):2488-96. Epub 2011 Feb 7*
12. Dummer R, Hauschild A, Guggenheim M, Jost L, Pentheroudakis G; ESMO Guidelines Working Group. Melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol 2010 May; 21 Suppl 5:v194-7*
13. Shuff JH, Siker ML, Daly MD, Schultz CJ. Role of radiation therapy in cutaneous melanoma. *Clin Plast Surg 2010 Jan; 37(1):147-60*
14. Amer MH, Al-Sarraf M, Baker LH, Vaitkevicius VK. Malignant melanoma and central nervous system metastases: incidence, diagnosis, treatment and survival. *Cancer 1978 Aug; 42(2):660-8*
15. Choi KN, Withers HR, Rotman M. Intracranial metastases from melanoma. Clinical features and treatment by accelerated fractionation. *Cancer 1985 Jul 1; 56(1):1-9*
16. Salvati M, Frati A, D'Elia A, Pescatori L, Piccirilli M, Pietrantonio A, Fazi M, Santoro A. Single brain metastases from melanoma: remarks on a series of 84 patients. *Neurosurg Rev 2011 Sep 14. Epub ahead of print*
17. Zada G, Yu C, Pagnini PG, Khalessi AA, Zelman V, Apuzzo ML. Early decreased tumor volume following fractionated Gamma Knife Radiosurgery for metastatic melanoma and the role of "adaptive radiosurgery": case report. *Neurosurgery 2010 Aug; 67(2):E512-3*
18. Staudt M, Lasithiotakis K, Leiter U, Meier F, Eigentler T, Bamberg M, Tatagiba M, Brossart P, Garbe C. Determinants of survival in patients with brain metastases from cutaneous melanoma. *Br J Cancer 2010 Apr 13; 102(8):1213-8. Epub 2010 Apr 6*
19. Scorsetti M, Facoetti A, Navarria P, Bignardi M, De Santis M, Ninone SA, Lattuada P, Urso G, Vigorito S, Mancosu P, Del Vecchio M. Hypofractionated stereotactic radiotherapy and radiosurgery for the treatment of patients with radioresistant brain metastases. *Anticancer Res 2009 Oct; 29(10):4259-63*
20. Sloan AE, Nock CJ, Einstein DB. Diagnosis and treatment of melanoma brain metastasis: a literature review. *Cancer Control 2009 Jul; 16(3):248-55*

21. Yoshida M, Sato M, Yamamoto Y, Maehara T, Naohara T, Aono H, Sugishita H, Sato K, Watanabe Y. Tumor local chemohyperthermia using docetaxel-embedded magnetoliposomes: interaction of chemotherapy and hyperthermia. *J Gastroenterol Hepatol 2011 Nov 18. doi: 10.1111/j.1440-1746*
22. Maluta S, Schaffer M, Pioli F, Dall'oglio S, Pasetto S, Schaffer PM, Weber B, Giri MG. Regional hyperthermia combined with chemoradiotherapy in primary or recurrent locally advanced pancreatic cancer: an open-label comparative cohort trial. *Strahlenther Onkol 2011 Oct; 187(10):619-25. doi: 10.1007/s00066-011-2226-6. Epub 2011 Sep 19*
23. Ghahremani FH, Sazgarnia A, Bahreyni-Toosi MH, Rajabi O, Aledavood A. Efficacy of microwave hyperthermia and chemotherapy in the presence of gold nanoparticles: an in vitro study on osteosarcoma. *Int J Hyperthermia 2011; 27(6):625-36*
24. Storm FK, Baker HW, Scanlon EF et al. Magnetic-Induction Hyperthermia. *Cancer 1985 Jun 1; 55:2677-87*
25. Overgaard J, Gonzalez Gonzalez D, Hulshof MC, Arcangeli G, Dahl O, Mella O, Bentzen SM. Randomised trial of hyperthermia as adjuvant to radiotherapy for recurrent or metastatic malignant melanoma. European Society for Hyperthermic Oncology. *Lancet 1995 Mar 4; 345(8949):540-3*

13.0 *FOLLOW-UP*

13.1 Programmi di *follow-up*
13.2 Aspetti controversi

Il *follow-up* del melanoma è un argomento molto discusso con punti di vista molto divergenti tra loro a seconda dell'approccio.
Attualmente, c'è una considerevole differenza nel tipo di *follow-up* sia tra specialisti diversi che lo attuano, sia tra quelli della stessa specialità e sia tra diverse Nazioni, in quanto nella pratica clinica di tutti i giorni gli esami di *follow-up* vengono proposti spesso senza una logica accettabile e condivisa.
I controlli a lungo termine sono una parte importante nella gestione di questa malattia; due traguardi guidano sostanzialmente tutti i programmi che sono stati proposti: in primo luogo la diagnosi precoce delle recidive e secondariamente, la diagnosi precoce dei secondi melanomi (1).
Nell'80% dei casi le recidive sono diagnosticate per la prima volta nel corso del *follow-up,* quando le procedure del *follow-up* vengono portate avanti sistematicamente (2).
Un'analisi della sopravvivenza di 1.969 pazienti con melanoma in stadio I-III, seguiti nel periodo 1996-1998, evidenzia che la scoperta di recidive, durante i controlli di *follow-up* nel lungo periodo, può avvenire in una fase iniziale o più avanzata della malattia e questo aspetto chiaramente si riflette sulla tipologia di trattamenti utilizzati.
Il rilevamento di metastasi in fase iniziale è significativamente associato ad una migliore sopravvivenza rispetto alla diagnosi di metastasi in fase avanzata (3).
Inoltre, i controlli di *follow-up* offrono informazioni e rassicurazione al paziente.
Sebbene la necessità di un *follow-up* clinico sia, come idea, accettata universalmente, c'è ancora molto dibattito sulla durata, frequenza degli appuntamenti e tipologia degli esami strumentali.
In particolare lo scopo del *follow-up* è di monitorare da vicino il paziente, poiché il melanoma è un tumore che può comportarsi con un'assoluta anarchia e perciò necessita di un monitoraggio clinico e strumentale.

Un elemento da considerare quando si pianifica una strategia di *follow-up*, è la durata. La maggior parte degli Autori considera una durata, con intervalli variabili, di almeno 10 anni, poiché si tratta di una patologia con decorso totalmente imprevedibile e con possibilità di metastasi viscerali anche dopo diversi decenni.
Fin dai primi anni '90, sono stati formulati suggerimenti per la programmazione di uno schema di *follow-up* da utilizzare a livello Nazionale come base di un successivo consenso Internazionale.
La maggior parte degli studi raccomandava un minimo di visite annuali, per 10 anni, più frequenti per melanomi a più alto rischio di ricaduta, con una riduzione della frequenza annua da 4 a 1 volta con l'aumentare del tempo (1).

13.1 Programmi di *follow-up*

Proposte di programma di *follow-up* sono basate su calcoli di rischio di sviluppare una recidiva di melanoma (attraverso l'analisi dei dati retrospettivi di *follow-up*), su considerazioni di costo-efficacia e sulla possibilità di trattare i pazienti che sviluppano una recidiva. Sulla base di queste considerazioni, diversi Autori hanno raccomandato riduzioni nell'intensità del regime di *follow-up.* Tuttavia, non mancano pareri opposti basati su dati che indicherebbero come un *follow-up* più intensivo possa migliorare i risultati favorendo una precoce rilevazione delle recidive.
A tutt'oggi non esistono Linee Guida standardizzate ed universalmente concordate; le raccomandazioni del protocollo di *follow-up* variano da Paese a Paese con significative differenze di opinione e nella pratica clinica (4).
La chirurgia è un'efficace terapia, ma questo approccio è condiviso solo per la fase iniziale della malattia (5). Inoltre, nessuno studio ha valutato il ruolo prognostico delle differenti procedure diagnostiche nel rilevare, con anticipo, metastasi a distanza od analizzato il potenziale beneficio di iniziare il trattamento con una malattia più limitata.
Generalmente, il *follow-up* viene pianificato sia sulla base dell'istologia del tumore primario sia sullo stadio di malattia. Nonostante questo, un crescente numero di pazienti viene sottoposto a numerosi esami di *imaging* e di altre procedure e non esiste un consenso sulle indicazioni e sul significato di queste indagini

nei diversi stadi clinici della malattia, a fronte dell'ingente costo per il Sistema Sanitario (6).
Si possono classificare come esami strumentali di primo livello la Radiologia convenzionale e l'Ecografia, di secondo livello gli esami tomografici ed altri, di terzo livello la PET.
In generale, gli Ospedali che adottano un *follow-up* meno intensivo usano esame clinico, radiografie del torace ed ecografie dei linfonodi e del fegato, mentre le strutture che portano avanti un *follow-up* più intensivo utilizzano anche la TC, la Risonanza Magnetica con mezzo di contrasto e la PET.
Ai fini di confrontare i diversi tipi di *follow-up*, si devono considerare molti aspetti. Un primo elemento è che un *follow-up* che considera gli esami di radiologia convenzionale o quelli più complessi implica una quantità molto differente di esposizione a radiazioni (una TC del torace è equivalente a circa 400 radiografie del torace).
Dal punto di vista ematochimico, gli unici *marker* da considerare potrebbero essere LDH e proteina S-100. Secondo numerosi dati scientifici entrambi i marcatori sono utilizzabili, anche se solo LDH è stato incluso nella classificazione AJCC. Infatti, la proteina S100 non ha dato una risposta univoca nell'esperienza riportata in letteratura.
LDH è un noto fattore prognostico in pazienti con melanoma disseminato in fase IV, infatti un elevato valore di LDH è associato ad una ridotta sopravvivenza (7), mentre risulta che entrambi, proteina S100 e LDH, non abbiano valore prognostico nelle prime fasi della malattia. Un altro elemento prognostico potenzialmente promettente è la presenza di cellule tumorali circolanti. Anche su quest'argomento esistono dati discordanti.
In conclusione, allo stato attuale, non esiste parere univoco sull'utilità dell'utilizzo delle analisi sierologiche nella prognosi, nella stadiazione e nel *follow-up* del paziente con melanoma.
Anche per quanto riguarda le indagini strumentali, allo stato attuale, non sono disponibili dati su quale sia la strategia più appropriata tra un *follow-up* "intenso" e uno "meno intenso".
Generalmente, nelle Istituzioni dove un gruppo coordinato di specialisti si occupa di pazienti affetti da melanoma, vengono proposti esami di stadiazione e di *follow-up*, solitamente modulando il livello di indagine sulla base delle caratteristiche della malattia.
Negli Ospedali periferici, invece, spesso anche i pazienti con rischio molto basso di sviluppare metastasi sono sottoposti ad un programma

di esami diagnostici, che ragionevolmente può essere definito non necessario ed oltretutto rilevante come costo per il SSN.
Questo porta a preferire il più completo *planning* di esami pre-operatori e di *follow-up* sia ai fini di rassicurare il paziente, sia per salvaguardare il medico da eventuali contestazioni dal punto di vista medico-legale.
Relativamente alle procedure utilizzate delle diverse Nazioni, la situazione è molto eterogenea: alcuni Paesi non hanno limitazioni nei programmi degli esami che possono venire proposti e rimborsati, mentre altri propongono Linee Guida specifiche per approvare uno specifico piano di *follow-up*, con un rigoroso controllo sulle tipologie di indagini e sul *budge*t utilizzato.
Le Linee Guida per il *follow-up* del melanoma sono state formulate e pubblicate in diversi Paesi quali Regno Unito, Germania, Olanda, Australia, USA (8-12) ed anche in Italia, da parte della Società Italiana di Dermatologia medica, chirurgica, estetica e delle Malattie Sessualmente Trasmesse (SIDeMaST) (13) e dell'Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM) (14).

13.2 Aspetti controversi

In uno studio condotto nel periodo agosto 1996-agosto 1998, Garbe et al. hanno dimostrato che la visita medica è responsabile della scoperta del 50% di tutte le recidive (15) ed inoltre hanno raccomandato come controllo di *routine* nel *follow-up* indagini sierologiche e l'ecografia linfonodale (4).
Da una valutazione retrospettiva più estesa appare difficile giustificare controlli frequenti in pazienti con melanomi in stadio I e II, mentre appare ragionevole consigliare visite poco frequenti (1 o 2 all'anno) ed educare il paziente all'auto-esame della cute.
Un altro aspetto da definire riguarda lo specialista che dovrebbe condurre il *follow-up*: medici di base, dermatologi, chirurghi generali o plastici sono coinvolti nei diversi Paesi.
In Scozia è stato condotto uno studio retrospettivo osservazionale su pazienti con melanoma cutaneo primitivo invasivo senza evidenza di metastasi al momento della chirurgia, diagnosticato tra il 1979 ed il 1997; il *follow-up* è aggiornato alla fine del 1999.
Le caratteristiche clinico-patologiche ed il trattamento chirurgico dei pazienti sono stati valutati da 4 specialisti diversi confrontati sulla base

della sopravvivenza globale (OS), sopravvivenza libera da malattia (DFS) e dell'intervallo libero da recidiva (RF). Questo studio ha mostrato che esistono differenze significative tra il trattamento effettuato da dermatologi e chirurghi. La sopravvivenza è stata significativamente migliore nel gruppo trattato dai dermatologi, portando a suggerire un ruolo centrale di questi nel trattamento del melanoma. In particolare, ai fini della diagnosi di un secondo melanoma primario, in pazienti con molti nevi o con sindrome del nevo displastico, l'esperienza del dermatologo è essenziale.
D'altro canto, gli studi condotti su pazienti con melanoma in stadio I e II AJCC hanno mostrato che molte recidive vengono rilevate dal paziente o attraverso l'anamnesi e la visita effettuata dal medico.
Pertanto, oltre ai controlli di *routine,* per questa tipologia di pazienti non esistono prove per giustificare un controllo radiografico del torace o sierologico (proteina S-100 β).
Le Linee Guida utilizzate nel Regno Unito, Paesi Bassi ed Australia non considerano utili gli esami radiologici durante il *follow-up*. Sebbene *The German Society of Dermatology* raccomandi una radiografia al torace annuale per i pazienti con malattia localizzata e biennale per i pazienti con malattia *in transit* e/o malattia regionale, Garbe et al. hanno recentemente scoperto che solo lo 0,5%, delle quasi 2.400 radiografie di *routine* al torace effettuate nell'arco di 25 mesi, ha rinvenuto vere e proprie metastasi (4).
E' pertanto improbabile che risulti utile il controllo radiografico del torace ogni 6-12 mesi, in pazienti affetti da melanoma con linfonodo sentinella positivo. Infatti, tale approccio rileva soltanto la metà delle metastasi polmonari, difficilmente identifica pazienti per la chirurgia in una fase potenzialmente curativa e non porta ad una diagnosi precoce delle metastasi polmonari. Per contro, potrebbe causare ansia al paziente per l'alto tasso di falsi positivi.
L'analisi retrospettiva condotta da Meyers et al. su 118 pazienti con melanoma in stadio II e III, che hanno eseguito ecografie regolari con un minimo *follow-up* di 2 anni, ha evidenziato la ripresa di malattia nel 35% dei casi, di cui 43% presentano metastasi a distanza. Solo il 7% di questi pazienti era asintomatico e ha avuto recidive diagnosticate da ecografie di *routine*. Un altro 26% è stato diagnosticato con un *follow-up* clinico di *routine*, che includeva anamnesi e visite mediche (16).

Lo studio di Morton et al. ha valutato 108 pazienti con melanoma in stadio IIIA e IIIB, prospettivamente arruolati in uno schema di monitoraggio di radiografia del torace (CXR) ogni 6 mesi, oltre ad un *follow-up* clinico. Sono state riscontrate metastasi polmonari nel 21% dei pazienti, individuate nel 48% dei casi da controlli con CXR.
Questo studio conferma risultati precedenti di studi retrospettivi che hanno dimostrato che la CXR di *routine* non contribuisce al miglioramento della sopravvivenza in pazienti (17). Inoltre, i risultati di questi 2 studi ribadiscono il valore limitato delle ecografie di *routine* nel *follow-up* dei pazienti con melanoma.
In generale, per le persone affette da melanoma, non è stato osservato un vantaggio di sopravvivenza nei pazienti asintomatici, la cui recidiva polmonare era stata rilevata da una radiografia al torace di *routine*.
Infatti, sembra che il trattamento di coloro che hanno metastasi polmonari diagnosticate anche precocemente non contribuisca significativamente alla sopravvivenza globale. Tuttavia i pareri a questo proposito non sono uniformi.
E' evidente che finché non verranno sviluppati trattamenti realmente efficaci, solo un piccolo gruppo di pazienti con malattia in stadio IV, chirurgicamente asportabile, potrà trarre beneficio dalla diagnosi precoce delle metastasi polmonari.
Pochi studi hanno valutato l'effetto psicologico del *follow-up*: la conclusione è che controlli regolari hanno un effetto positivo sulla maggior parte dei pazienti, soddisfatti delle informazioni supplementari che vengono loro fornite.
L'ampia variabilità delle Linee Guida mostra che la politica sanitaria, le aspettative culturali ed i punti di vista personali hanno ancora dei ruoli molto importanti nel *follow-up* dei pazienti con melanoma, in assenza di dati basati su studi prospettici randomizzati.
I programmi di stadiazione stanno diventando sempre più accurati, per cui un *follow-up* radiologico intensivo potrebbe dare esito e diagnosi più precoci delle metastasi.
La definizione del miglior schema di *follow-up* da proporre ai pazienti con melanoma presenta diverse implicazioni, alcune legate alla sopravvivenza del paziente ed alla qualità di vita, altre presentano rilevanza socio-sanitaria.
Se lo schema di *follow-up* ha un ruolo nella prognosi dei pazienti con melanoma, è utile dimostrarlo, poiché tutti gli sforzi del trattamento sono dedicati a migliorare la sopravvivenza globale come obiettivo primario.

Se, al contrario, un *follow-up* intensivo non dovesse migliorare la sopravvivenza globale, l'eventualità di diagnosi precoci di malattia in stadio IV porterebbe ad un peggioramento nella qualità di vita del paziente. Infatti, una condizione di malattia metastatica scoperta, grazie ad una sofisticata procedura diagnostica, alcuni mesi prima di diventare sintomatica esporrebbe il paziente a trattamenti anti-tumorali protratti per un periodo più lungo di vita, con la consapevolezza angosciante di avere una malattia metastatica contro cui può essere fatto molto poco.
Inoltre, dal punto di vista socio-sanitario, se un intenso schema di *follow-up* non migliorasse la sopravvivenza globale, i costi sociali per la diagnostica e la cura del paziente potrebbero essere ridotti utilizzando uno schema di *follow-up* minimo.
D'altro canto, se i risultati ottenuti fossero a favore di un *follow-up* intensivo, questo potrebbe dimostrare che le metastasi possono diffondersi ulteriormente e che una chirurgia od un approccio medico sono utili per questi pazienti.
In questo caso, un intensivo programma di *follow-up* radiologico (TC e RM *total body* ripetute frequentemente) dovrebbe migliorare la sopravvivenza globale.
Si sa che, per sua natura, la TC implica dosi di radiazioni più elevate rispetto alle più comuni procedure di radiologia e che i costi di entrambe, TC e RM, sono rilevanti. In particolare, è interessante rilevare come l'uso di TC sia aumentato rapidamente sia negli USA sia altrove, soprattutto in Giappone (18); un sondaggio condotto nel 1996, ha stimato che il numero di TC è di 26 negli Stati Uniti e 64 in Giappone per 1 milione di abitanti. E' stato stimato che più di 62 milioni di TC sono eseguite ogni anno negli Stati Uniti, rispetto ai circa 3 milioni effettuate nel 1980. Tale brusco aumento è da imputare agli avanzamenti tecnologici della TC, che la rendono di utilizzo comune per il paziente e per il medico. Ovviamente, l'aumentato ricorso alla TC si riflette in un'aumentata esposizione a radiazioni di un'elevata fascia di popolazione in *follow-up*.
Un concorrente emergente della TC è la RM *total body* che comporta maggiore tempo di scansione e costi, ma elimina il pericolo di esposizione alle radiazioni.
E' importante riconoscere che sono necessari degli studi prospettici per determinare quale mezzo tecnico sia in grado di offrire il miglior risultato terapeutico non solo in termini di sopravvivenza, ma anche di qualità di vita.

Inoltre, al momento non è stato raggiunto un consenso sui test sierologici di laboratorio durante il *follow-up* dei pazienti con melanoma (19).
I pazienti affetti da melanoma con metastasi linfonodali, generalmente eseguono analisi diagnostiche strumentali per escludere la presenza di metastasi a distanza, con la periodicità variabile da Nazione a Nazione e da specialista a specialista. Pochi studi si sono occupati degli aspetti psicologici e della percezione da parte dei pazienti nei confronti dei test diagnostici. I pazienti sperimentano significativamente più disagio durante la PET che durante la TC. Il peso psicologico complessivo sopportato dai pazienti è ritenuto comunque relativamente basso e non dovrebbe interferire con la scelta di un test diagnostico basato sull'accuratezza, sui costi e sulla tipologia dei pazienti da valutare. In ogni caso, è utile spiegare la procedura e rispondere alle domande dei pazienti per ridurne il peso psicologico (20).
Le procedure diagnostiche *total body* stanno diventando sempre più di *routine* nella pratica clinica ai fini della stadiazione e lo sviluppo di tecniche più avanzate di *scanning* come TC, RM e PET consente la diagnosi di metastasi sempre più piccole (3-5 mm).
Peraltro, la mancanza di informazioni nelle lesioni di diametro ≤ 1 cm costituisce un aspetto importante nella gestione del paziente.
Le cosiddette procedure di diffusione-pesata WB-MR promettono di facilitare la diagnosi di linfonodi metastatici. Per la capacità di definizione dei tessuti molli, la RM ha lo specifico vantaggio per la diagnosi delle metastasi a distanza, specialmente nello scheletro, nel cervello, nei tessuti molli e nel fegato. L'accuratezza diagnostica della stadiazione a distanza con WB-MR è del 93 fino al 97%. Gli studi pubblicati sulla diffusione-pesata WB-MR indicano che questo metodo può migliorare distintamente la sensibilità per le metastasi linfonodali. WB-MR sarebbe perciò particolarmente adatta per i tumori che metastatizzano frequentemente a questi organi come il tumore della mammella, il carcinoma colorettale o il melanoma.
I risultati, in tali casi, sono paragonabili a quelli della PET-TC nei tumori con buon stoccaggio di 18F-Fluorodeossiglucosio. Nella rilevazione delle metastasi polmonari o nella stadiazione delle lesioni polmonari, tuttavia, WB-MR ha delle limitazioni in termini di sensibilità diagnostica, paragonata alle procedure convenzionali come TC o PET-TC, dovute ad artefatti legati al movimento ed al contrasto del parenchima polmonare.

Occorre ricordare che il paziente sottoposto a PET-TC riceve 10 mSv, mentre attraverso una TC *total body*, 30 mSv (esame completo di basale e fasi arteriosa+portale). 10 mSv di una PET non sono poi pochi, ma sempre meno rispetto a quelli di una TC, la cui capacità di individuare piccole lesioni è però indiscutibilmente maggiore.
Come accennato, si sta discutendo se non sia più indicata la RM *total body*, ma a quel punto, in ogni caso, l'individuazione di lesioni ad interesse *sub-clinico* porrebbe altri importanti quesiti sulle successive indicazioni cliniche.
Ad esempio, nel caso ci si dovesse concentrare sullo studio di micronoduli polmonari, per la ripetizione ravvicinata di un'indagine sofisticata, può essere proposta una TC a basso dosaggio con meno di 1 mSv somministrato al paziente.
Si ritiene che la maggior parte dei pazienti a cui sono state inizialmente diagnosticate delle metastasi a distanza solitarie abbia già multiple metastasi occulte subcliniche, che diventeranno clinicamente evidenti dopo un'eventuale asportazione chirurgica, ma tale situazione non è facilmente prevedibile al momento della scelta chirurgica o meno di fronte ad un paziente in stadio IV, potenzialmente operabile.

In conclusione, come per la stadiazione, anche per il *follow-up*, l'atteggiamento nei confronti dei pazienti con melanoma è molto controverso. Cercando di sintetizzare le indicazioni provenienti dalla letteratura si evince, ad esempio, che i controlli possono essere meno intensivi per i pazienti con spessore di Breslow < 1 mm e più frequenti in caso di spessore maggiore e concentrati soprattutto nei primi 2-3 anni dopo l'intervento, dal momento che in questo periodo si verifica la maggior parte (95%) delle riprese di malattia.
Tuttavia, considerando la storia naturale della malattia, in linea di massima si consiglia di proseguire il monitoraggio clinico-strumentale fino ai 5 anni e successivamente di sottoporre il paziente ad una visita dermatologica annuale per il resto della vita (rischio di nuovi melanomi primitivi). Per quanto riguarda gli esami strumentali da utilizzare, si rimanda alle considerazioni fatte nel capitolo della stadiazione (vedi cap. 8.0). Dal punto di vista dei marcatori sierici, gli unici da prendere in considerazione potrebbero essere LDH e proteina S-100, anche se soltanto alla prima è stato riconosciuto un valore prognostico nelle fasi avanzate della malattia ed il suo monitoraggio può contribuire alla valutazione della risposta nei pazienti sottoposti a trattamento sistemico per metastasi.

BIBLIOGRAFIA

1. Leiter U, Buettner PG, Eigentler TK, Bröcker EB, Voit C, Gollnick H, Marsch W, Wollina U, Meier F, Garbe C. Hazard rates for recurrent and secondary cutaneous melanoma: An analysis of 33,384 patients in the German Central Malignant Melanoma Registry. *J Am Acad Dermatol 2011 Jun 21*
2. Garbe C, Schadendorf D. Surveillance and follow-up examinations in cutaneous melanoma. *Onkologie 2003; 26:241-6*
3. Leiter U, Buettner PG, Garbe C et al. Is detection of melanoma metastasis during surveillance in an early phase of development associated with a survival benefit? *Melanoma Res 2010 Jun; 20(3):240-6*
4. Garbe C, Paul A, Kohler-Späth H, Ellwanger U, Stroebel W, Schwarz M, Schlagenhauff B, Meier F, Schittek B, Blaheta HJ, Blum A, Rassner G. Prospective Evaluation of a Follow-Up Schedule in Cutaneous Melanoma Patients: Recommendations for an Effective Follow-Up Strategy. *J Clin Oncol 2003 Feb 1; 21(3):520-9*
5. Morton DL. Immune response to postsurgical adjuvant active immunotherapy with Canvaxin polyvalent cancer vaccine: correlations with clinical course of patients with metastatic melanoma. *Dev Biol (Basel) 2004; 116:209-17 discussion 229-36*
6. Forschner A, Eigentler TK, Pflugfelder A, Leiter U, Weide B, Held L, Meier F, Garbe C. Melanoma staging: Facts and controversies. *Clin Dermatol 2010 May-Jun; 28(3):275-80*
7. Garbe C, Leiter U, Ellwanger U et al. Diagnostic value and prognostic significance of protein S-100 ß, Melanoma-Inhibitory Activity, and Tyrosinase/Mart-1 Reverse Transcription-Polimerase chain reaction in the follow-up of high-risk melanoma patients. *Cancer 2003 Apr 1; 97(7):1737-45*
8. Marsden JR, Newton-Bishop JA, Burrows L, Cook M, Corrie PG, Cox NH, Gore ME, Lorigan P, MacKie R, Nathan P, Peach H, Powell B, Walker C; British Association of Dermatologists Clinical Standards Unit. Revised U.K. guidelines for the management of cutaneous melanoma 2010. *Br J Dermatol 2010 Aug; 163(2):238-56. Epub 2010 Jul 1*
9. Garbe C, Schadendorf D, Stolz W, Volkenandt M, Reinhold U, Kortmann RD, Kettelhack C, Frerich B, Keilholz U, Dummer R, Sebastian G, Tilgen W, Schuler G, Mackensen A, Kaufmann R, Hauschild A. Short German guidelines: Malignant melanoma. *J Dtsch Dermatol Ges 2008 May; 6 Suppl 1:S9-S14*
10. Kroon BB, Nieweg OE, Hoekstra HJ, Lejeune FJ. Principles and guidelines for surgeons: management of cutaneous malignant melanoma. *Eur J Surg Oncol 1997 Dec; 23(6):550-8*

11. Clinical Practice Guidelines for the Management of Melanoma in Australia and New Zealand. Approved by the National Health and Medical Research Council on 31 October 2008© *Cancer Council Australia/Australian Cancer Network/Ministry of Health, New Zealand 2008*
12. Poo-Hwu WJ, Ariyan S, Lamb L, Papac R, Zelterman D, Hu GL, Brown J, Fischer D, Bolognia J, Buzaid AC. Follow-Up Recommendations for Patients with American Joint Committee on Cancer Stages I-III Malignant Melanoma. *Cancer 1999 Dec 1; 86(11):2252-8*
13. Quaglino P, Borgognoni L, Bottoni U, Calvieri S, Carli P, Catricalà C, Eibenschutz L, Manganoni A, Moretti S, Pellacani G, Pimpinelli N, Seidenari S, Bernengo MG; from the Gruppo Italiano di Dermatologia Oncologica (GIDO) and the Gruppo Italiano Polidisciplinare sul Melanoma (GIPMe). Linee guida di stadiazione e follow-up del melanoma cutaneo stadio I-II. *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia 2007 Feb; 142(1):41-7*
14. Bajetta E. Linee guida AIOM 2010 - Melanoma Referee: Ridolfi R. Istituto Oncologico Romagnolo
15. Garbe C. A rational approach to the follow-up of melanoma patients. Recent Result. *Cancer Res 2002; 160:205-15*
16. Meyers MO, Yeh JJ, Frank J, Long P, Deal AM, Amos KD, Ollila DW. Method of detection of initial recurrence of stage II/III cutaneous melanoma: analysis of the utility of follow-up staging. *Ann Surg Oncol 2009 Apr; 16(4):941-7 Epub 2008 Dec 20*
17. Morton RL, Craig JC, Thompson JF. The role of surveillance chest X-rays in the follow-up of high-risk melanoma patients. *Ann Surg Oncol 2009 Mar; 16(3):571-7. Epub 2008 Nov 22*
18. Brenner DJ, Hall EJ. Computed tomography - An increasing source of radiation exposure. *N Engl J Med 2007; 357:2277-84*
19. Egberts F, Hitschler WN, Weichenthal M, Hauschild A. Prospective monitoring of adjuvant treatment in high-risk melanoma patients: lactate dehydrogenase and protein S-100B as indicators of relapse. *Melanoma Res 2009; 19:31-35*
20. Bastiaannet E, Hoekstra-Weebers J, Francken AB et al. Perception of burden experienced during diagnostic tests by melanoma patients with lymph node metastases. *Melanoma Res 2009 Feb; 19(1):36-41*

14.0 DIRETTIVE FUTURE

Diagnosi del melanoma primitivo

La caratterizzazione molecolare del tumore primitivo apre nuove strade per sperimentare e valutare nuove opportunità terapeutiche. La perdita di *PTEN* (25-50%), l'amplificazione di *MITF* (10-15%), *CDK2/4* (20%) e della ciclina D (30%) sono frequentemente osservate. Inoltre, è comune la sovra-espressione di *BCL-2*, così come la perdita di *p16*. Mutazioni di *c-Kit* si osservano nel 20-40% dei melanomi acrali e delle mucose, di *GRIN* nel 22%, *NRAS* nel 15% e *BRAF* nel 50-65% (1,2). Queste mutazioni, il loro significato prognostico e la possibilità di indicare trattamenti con farmaci mirati fanno ipotizzare una nuova classificazione del melanoma cutaneo, come suggerito da Bastian et al del *Memorial Sloan Kettering Cancer Centre* (1).

Trattamento del tumore primitivo

Gli studi randomizzati disegnati per confrontare margini di escissione del tumore primitivo > 2-5cm e < 1-2cm hanno dimostrato una sostanziale non inferiorità di margini di exeresi ridotti rispetto a margini ampi. Solo uno studio, eseguito in pazienti con spessore di Breslow elevato, ha riportato un maggior rischio di recidive loco-regionali. Analizzando questo ultimo *end-point* in una meta-analisi, si è visto come melanomi a spessore maggiore potrebbero beneficiare di escissioni maggiormente ampie (3). Anche se rimangono da conoscere i risultati di uno studio sul trattamento chirurgico di melanomi di elevato spessore, la relativa scarsa uniformità ed il basso potere degli studi fino ad ora eseguiti suggeriscono il disegno di un nuovo studio randomizzato, condotto in pazienti con melanoma di spessore intermedio ed elevato.

Biopsia del linfonodo sentinella

Si attendono i risultati definitivi dello studio MSLT-1 (*Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial-1*). La terza e la quarta analisi intermedia hanno evidenziato come la rimozione delle metastasi linfonodali allo stadio subclinico, ottenuta grazie alla biopsia del linfonodo sentinella e alla linfoadenectomia di completamento,

potrebbe avere un impatto terapeutico nei pazienti con linfondo sentinella positivo (4).
Lo studio MSLT-2, che confronta la prognosi di pazienti con linfonodo sentinella positivo sottoposti o non a linfoadenectomia, chiarirà il ruolo della linfoadenectomia precoce nel trattamento delle metastasi linfonodali da melanoma.
Nell'ultimo decennio, numerosi studi hanno valutato il valore predittivo e prognostico di misurazioni micro-morfometriche della metastasi nel linfonodo sentinella. I risultati dello studio osservazionale *Minimal Sentinel Node Tumor Burden* (MINITUB), in cui i pazienti con linfonodo sentinella positivo, ma con carico di malattia minimo (localizzazione sottocapsulare con diametro ≤ 0,4 mm, o diametro ≤ 0,1 mm) sono seguiti con la sola osservazione, e quelli provenienti dal MSLT-2 forniranno preziose informazioni circa il significato del quantitativo di malattia nel linfonodo sentinella.
A questo proposito, una maggiore standardizzazione dei protocolli di anatomia patologica per la valutazione del linfonodo sentinella (ad oggi, sono essenzialmente i 3 messi a punto da Cochran, Cook e Scolyer) e l'individuazione di parametri ad elevata riproducibilità, rappresentano un punto di partenza irrinunciabile (5).

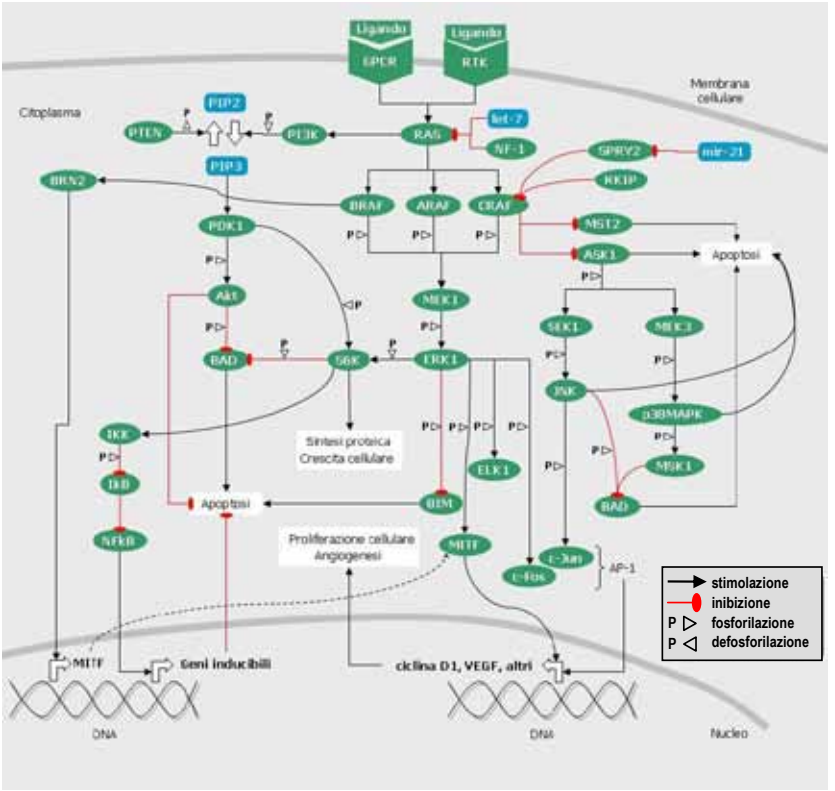
Terapia adiuvante
Ad oggi, l'unico trattamento approvato dopo linfoadenectomia radicale è l'Interferone (IFN) alfa. Pazienti trattati con IFN hanno un beneficio di sopravvivenza del 3% (6). L'individuazione di fattori predittivi di risposta può considerevolmente restringere il numero di pazienti trattati ed aumentare l'indice terapeutico dell'IFN. Sembra che i pazienti con melanoma ulcerato possano meglio beneficiare del trattamento con IFN. Questa osservazione, unita alla recente approvazione dell'IFN peghilato (PEG) da parte della FDA (*Food&Drug Administration*), ha portato al disegno di uno studio che confronterà IFN-PEG e l'osservazione in pazienti con melanoma ulcerato di spessore > 1 mm (EORTC18081). La valutazione della malattia minima residua eseguita mediante studio delle cellule tumorali circolanti, è un approccio promettente per candidare ad IFN i pazienti con cellule di melanoma circolanti. Infine, numerose vie metaboliche (ad esempio, JAK/STAT) sono state saggiate con risultati incoraggianti.
Di particolare interesse sembra la combinazione dell'IFN con anticorpi contro CTLA-4 (Ipilimumab e Tremelimumab), in grado di interrompere la tolleranza immunologica del paziente verso il melanoma.

Sulla base di incoraggianti risultati provenienti da uno studio di fase II sull'Ipilimumab in adiuvante in 75 pazienti HLA-A*0201 positivi, è stato condotto uno studio di fase III (EORTC18071), i cui primi risultati sono attesi per la fine del 2013.
Un recente studio randomizzato sulla radioterapia adiuvante dopo linfoadenectomia ha evidenziato un miglior controllo della malattia regionale in pazienti sottoposti a terapia radiante. I risultati definitivi dello studio sono attesi per stabilire le indicazioni ed il ruolo della radioterapia in questo *set* di pazienti. Esistono inoltre evidenze che la radioterapia possa migliorare il controllo locale, in caso di melanoma desmoplastico. A riguardo, è in corso uno studio che confronta radioterapia ed osservazione dopo escissione ampia di melanoma desmoplastico.

Malattia metastatica
Ad oggi, la chirurgia è considerata la terapia di prima scelta per le metastasi singole da melanoma. Uno studio (Stage IV) è stato disegnato per confrontare la chirurgia ed il miglior trattamento medico disponibile e si attende il suo avvio.
Negli ultimi 30 anni, non vi sono stati significativi miglioramenti nel trattamento medico della malattia a distanza.
La Dacarbazina, l'Interleuchina-2 e la Fotoemustina, in Europa, erano gli unici farmaci approvati per il trattamento del melanoma metastatico, con risultati comunque modesti.
La situazione è cambiata repentinamente nell'ultimo decennio ed in particolare negli ultimi 2 anni, con l'introduzione di modulatori del sistema immunitario e terapie *target*.
Numerosi studi clinici (vedi Tabella 1, sottocap. 11.4) sono in corso di disegno o di arruolamento per valutare inibitori specifici di molecole di trasduzione del segnale che risultino essere espresse in sottopopolazioni di pazienti con melanoma (7,8).

BRAF
BRAF è una serina-treonina chinasi, mutata in oltre la metà dei pazienti con melanoma, principalmente in pazienti giovani ed in assenza di elastosi cutanea (Figura 1). Ad oggi, non è stato dimostrato un sicuro significato prognostico della mutazione di *BRAF* nel tumore primitivo.

Figura 1



La sovra-attivazione della via RAS/MAPK è frequentemente identificata in svariati tipi tumorali, incluso il melanoma ed è riconosciuta come significativamente coinvolta nello sviluppo e nella progressione tumorale. In particolare, nel melanoma si osservano mutazioni di NRAS e BRAF nel 15-20% e 60% circa dei casi, rispettivamente

Risultati ottenuti con inibitori non selettivi, Sorafenib e RAF265 (solo uno studio di fase I), sono stati modesti.
Un inibitore selettivo di BRAF mutato (mutazione V600E), il Vemurafenib, è stato saggiato in studi di fase I (BRIM-I), II (BRIM-II)

e III (BRIM-III in confronto con Dacarbazina) (vedi cap. 11.0). Risposte cliniche si sono osservate in circa il 50% dei casi, con un aumento mediano di sopravvivenza di quasi 3 mesi nello studio di fase III (9). Questi risultati hanno portato all'approvazione del trattamento da parte del FDA nell'agosto 2011. Tuttavia, i risultati sono stati inferiori a quelli attesi dopo lo studio di fase II. Questa evidenza è stata spiegata con l'osservazione che l'inibizione di BRAF porta all'attivazione della via metabolica del MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), che stimola la crescita tumorale attraverso CRAFT. L'inibizione di MEK (AZD6244, GSK1120212), che ha un ruolo chiave nella via metabolica di MAPK, contestualmente a quella di BRAF potrebbe migliorare i risultati e ridurre l'incidenza di carcinomi squamosi, evento avverso che si verifica in circa un quarto dei casi trattati con inibitori di BRAF.
Un altro farmaco attivo su CRAFT è la Geldanamycin, un inibitore della HSP90 (*Heat-Shock Protein 90*), proteina coinvolta nel funzionamento di BRAF V600E. Combinazioni di inibitori di BRAF e di questo farmaco sono allo studio. Inibitori della HDAC (HDACIs, HDAC *inhibitors*) si sono dimostrati efficaci nel melanoma, e la combinazione con inibitori di BRAF è allo studio.
Similmente al Vemurafenib, l'inibitore di BRAF GSK2118436, sviluppato principalmente in Australia, ha ottenuto un tasso di risposta intorno al 60% con incoraggianti risultati per le metastasi cerebrali. Si attendono i risultati definitivi dello studio di fase II e quelli provenienti dallo studio di fase III che confronta il GSK2118436 con la Dacarbazina.

NRAS
La mutazione di NRAS è presente nel 20% dei melanomi, ma non esistono farmaci che lo aboliscano direttamente. Esistono evidenze che la contemporanea inibizione delle vie MAPK e PI3K possa bloccare l'effetto di RAS.

c-KIT
Mutazioni o amplificazioni di *c-KIT* sono presenti nel 39% dei melanomi delle mucose, nel 36% dei melanoma acrali e nel 28% di quelli che insorgono su cute con elastosi solare. I recenti risultati (10) sono stati discussi nel capitolo 11.0. Attualmente, sono in corso uno studio di fase II sul Nilotinib ed uno di fase III che confronta Nilotinib e Dacarbazina.

Ipilimumab
Nel 2011 l'Ipilimumab, al dosaggio di 3 mg/kg, per 3 mesi con 3 settimane di intervallo, è stato approvato per il trattamento del melanoma metastatico per la sua capacità di indurre durature risposte (11,12). I risultati degli studi condotti sono stati descritti nel capitolo 11.0.
Pochi dati esistono sulla combinazione dell'inibizione di CTLA-4 con altri farmaci. Ad oggi, sono state valutate combinazioni con IL-2 (17% di risposte complete durature in uno studio di fase II), IFN (Tremelimumab più IFN, 30% di risposte, tutte durature, in uno studio di fase II) e Bevacizumab (38% di risposte in uno studio di fase II).
Studi che combinano inibitori di BRAF ed Ipilimumab, per ottenere elevato tasso di risposta con la significativa durata, sono in corso di programmazione.

Nuovi anticorpi monoclonali a funzione immunomodulatoria
L'anticorpo monoclonale contro il PD-1R (*Programmed Death-1 Receptor*), una molecola di co-stimolo che regola l'attivazione delle cellule T e la tolleranza immunologica, può essere utile per interrompere la tolleranza. Uno studio di fase I ha mostrato una significativa attività del farmaco, a fronte di un minor numero di effetti collaterali rispetto all'Ipilimumab.
Anticorpi contro OX44, 4-1BB hanno attività agonistica per l'attivazione delle cellule T, mentre anticorpi anti-CD25 inibiscono i linfociti T regolatori. Questi farmaci sia singolarmente sia in combinazione sembrano efficaci, con modesti effetti collaterali.
In conclusione, tra le prospettive future occorre citare il potenziale immunoadiuvante della chemioterapia e lo sviluppo di vaccini preventivi in pazienti a rischio di ricaduta.

BIBLIOGRAFIA

1. Broekaert SM et al. Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res 2010; 23(6):763-70*
2. Scolyer RA, Long GV, Thompson JF. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol Oncol 2011; 5(2):124-36*

3. Mocellin S, Pasquali S, Nitti D. The impact of surgery on survival of patients with cutaneous melanoma: revisiting the role of primary tumor excision margins. *Ann Surg 2011; 253(2):238-43*
4. Morton DL et al. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med 2006; 355(13):1307-17*
5. Scolyer RA, Prieto VG. Melanoma pathology: important issues for clinicians involved in the multidisciplinary care of melanoma patients. *Surg Oncol Clin N Am 2011; 20(1):19-37*
6. Mocellin S et al. Interferon alpha adjuvant therapy in patients with high-risk melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst 2010; 102(7):493-501*
7. Eggermont AM, Robert C. New drugs in melanoma: It's a whole new world. *Eur J Cancer 2011; 47(14):2150-7*
8. Romano E et al. Treatment implications of the emerging molecular classification system for melanoma. *Lancet Oncol 2011; 12(9):913-22*
9. Chapman PB et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med 2011; 364(26):2507-16*
10. Carvajal RD et al. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA 2011; 305(22):2327-34*
11. Robert C et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med 2011; 364(26):2517-26*
12. Hodi FS et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med 2010; 363(8):711-23*

ACRONIMI

AAM	Antigeni Associati al Melanoma
ABCDE	Asimmetria, Bordi, Colore, Dimensioni, Evoluzione
ALM	Acral Lentiginous Melanoma
AMP	Adenosina monofosfato
APC	Annual Percentage Change
ARG1	Arginase 1
BAD	BCL-2 Antagonist of cell Death
BCG	Bacillo di Calmette-Guérin
BLS	Biopsia del Linfonodo Sentinella
BMI	Body Mass Index
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CI	Confidence Interval
CSD	Aree cutanee esposte cronicamente al sole
CT/ CTA	Cancer Testis/ Cancer Testis Antigen
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4
CXR	Chest Radiograph
DC	Dendritic Cell
DFS	Disease Free Survival
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
DNS	Dysplastic Nevus Syndrome
DSS	Disesase Specific Survival
DTIC	Dacarbazina
DW	Diffusion Weighted
ECT	Electrochemiotherapy
EFG	Elevated Firm Growing
ELM	Epiluminescence Light Microscopy
EMEA	European Agency for the Evaluation of Medicinal products
FA	Fosfatasi Alcalina
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FDG-PET	Fluorodeoxyglucose-PET
G-CSF	Granulocyte-Colony-Stimulating Factor
GGT	Gamma-Glutamil Transpeptidasi
GWAS	Genome-Wide Association Study
HDAC	Histone Deacetylase
HDI	High-Dose IFN
HGF	Hepatocyte Growth Factor

HLA	Human Leukocyte Antigen
HMW-MAA	High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen
HR	Hazard Ratio
HRT	Hormone Replacement Therapy
HSP	Heat Shock Proteins
IDI	Intermediate-Dose IFN
IDMC	Independent Data Monitoring Committee
IDO	Indolamina 2,3 diossigenasi
IFN	InterFeroN
IHC	Immunohistochemistry
IL	InterLeukin
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
IPD	Individual Patient Data
LAK	Lymphokine-Activated Killer cell
LC	Linfoadenectomia di Completamento
LDFS	Locoregional Disease-Free Survival
LDH	L-Lattato Deidrogenasi
LDI	Low-Dose IFN
LMM	Lentigo Maligna Melanoma
LS	Linfonodo Sentinella
LT	Linfoadenectomia Terapeutica
MAGE	Melanoma-associated antigen
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MC1R	Melanocortin-1 Receptor
MDM2	Murine Double Minute 2
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cells
MIA	Melanoma-Inhibiting Activity
MITF	Microphthalmia-associated Transcription Factor
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MMG	Medico di Medicina Generale
MMP	Matrix MetalloProteinase
MPM	Multiple Primary Melanoma
MSH	Melanocyte Stimulating Hormone
MTKi	Multitargeted Tyrosine Kinase inhibitors
MU	Million Unit
NM	Nodular Melanoma
OR	Odds Ratio
OS	Overall Survival
PAF	Population Attributable Fraction
PCR	Polymerase Chain Reaction

PD1	Programmed Death 1
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PEG	Polietilenglicole
PET	Positron Emission Tomography
PFS	Progression-Free Survival
PI 3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
RAD	Radiation Absorbed Dose
RB	Retinoblastoma
RCM	Reflectance Confocal Microscopy
RHC	Red Hair Color
RM / RMN	Risonanza Magnetica / Risonanza Magnetica Nucleare
RR	Relative Risk
RT-PCR	Real Time - Polymerase Chain Reaction
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
SSM	Superficial Spreading Melanoma
TAC / TC	Tomografia Assiale Computerizzata / Tomografia Computerizzata
TCP	Tumor Control Probability
TCR	T Cell Receptor
TGF	Transforming Growth Factor
TILs	Tumor-Infiltrating Lymphocytes
TMA	Tissue Micro Array
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPA	Tissue Plasminogen Activator
T reg	T regulatory cells
VLDI	Very Low-Dose IFN
WB-MR	WholeBody-Magnetic Resonance
WHO	World Health Organization
WT	Wilde Type

NOTE:

NOTE: