

UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

RUOLO DELL'ANGIOGENESI NELLA PROGRESSIONE DEL MELANOMA CUTANEO E MUCOSO

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa

ORIANA SIMONETTI

Tesi di Laurea di:

DAVIDE MENGARELLI
detto RINALDINI

A.A. 2019/2020

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato e supportato nella stesura di questa tesi. In primis ringrazio la Prof.ssa Oriana Simonetti per aver accettato il ruolo di Relatore di questo lavoro di tesi e per la sua disponibilità e professionalità. Parimenti vorrei ringraziare il Dott. Federico Diotallevi per avermi seguito, passo dopo passo, nella realizzazione di questo elaborato con competenza e cortesia.

Un doveroso ringraziamento va ai miei genitori che mi hanno supportato e mi hanno permesso di affrontare questo percorso.

Infine, un ringraziamento speciale va a Simon, che mi è sempre stato accanto e mi ha incoraggiato anche nei momenti più difficili.

Indice

INTRODUZIONE 9

PARTE 1: IL MELANOMA 10

1.1 Definizione ed Epidemiologia 10

1.2 Fattori di Rischio 11

1.3 Genetica 13

1.3.1 Via delle MAPK 14

1.3.2 Via PI3K – AKT3 14

1.3.3 BRAF 15

1.3.4 NRAS 16

1.3.5 C-KIT 17

1.3.6 GNAQ / GNA11 18

1.3.7 NF1 18

1.3.8 PTEN 19

1.3.9 MITF 19

1.3.10 CDKN2A 20

1.3.11 MC1R 20

1.3.12 Altri geni 21

1.4 Prevenzione 21

1.5 Diagnosi 22

1.5.1 Esame Clinico 22

1.5.2 Dermatoscopia 24

1.5.3 Biopsia 25

1.5.4 Istologia 25

1.5.5 Test di Laboratorio 27

1.5.6 Imaging 27

1.5.7 Biopsia del Linfonodo Sentinella 28

1.6 Fattori prognostici 29

1.6.1 Fattori Prognostici nel melanoma primario 29

1.6.2 Fattori prognostici nelle metastasi regionali 35

1.6.3 Fattori prognostici nelle metastasi distali 36

1.7 Stadiazione 36

1.7.1 Stadi I e II 37

1.7.2 Stadio III 37

1.7.3 Stadio IV 37

1.7.4 Melanoma metastatico da lesione primaria sconosciuta 38

1.7.5 La classificazione AJCC 39

1.8 Istopatologia 43

1.8.1 Melanoma a diffusione superficiale 44

1.8.2 Melanoma nodulare 44

1.8.3 Lentigo maligna e lentigo maligna melanoma 45

1.8.4 Melanoma lentigginoso acrale 46

1.8.5 Melanoma desmoplastico 47

1.8.6 Melanoma mucoso 47

1.8.7 Melanoma nevoide 48

1.8.8 Melanoma Spitzoide 48

1.8.9 Melanoma Uveale 49

1.9 Trattamento chirurgico del melanoma primario 49

1.10 Trattamento chirurgico metastasi locoregionali 50

1.10.1 Malattia linfonodale microscopica 50

1.10.2 Malattia linfonodale macroscopica 51

1.11 Trattamento adiuvante 51

1.11.1 Interferon-α 51

1.11.2 Immunoterapia e Target therapy 52

1.11.3 Radioterapia adiuvante 52

1.12 Trattamento delle metastasi satellite o in-transit 53

1.12.1 Interleuchina-2 Intralesionale 53

1.12.2 Talimogene Laherparepvec (T-VEC) 54

1.12.3 Elettrochemioterapia (ECT) 54

1.12.4 Perfusione isolata degli arti (ILP) 55

1.13 Trattamento della malattia metastatica non operabile 55

1.13.1 Chirurgia e radioterapia 56

1.13.2 Immunoterapie 56

1.13.2.1 Blocco dei checkpoint immunologici 57

1.13.2.2 Interleuchina 2 ad alte dosi 59

1.13.3 Target therapy 60

1.13.3.1 Inibitori di BRAF/MEK 60

1.13.3.2 Inibitori di c-KIT 62

1.13.4 Chemioterapia ... 62

1.14 Trattamento del melanoma primitivo delle mucose ... 63

1.15 Trattamento del melanoma uveale ... 63

1.16 Trattamento delle recidive ... 64

1.17 Algoritmo terapeutico ... 65

1.18 Follow-up ... 66

PARTE 2: STUDIO ... 68

2.1 Introduzione ... 68

2.2 Materiali e metodi ... 70

2.2.1 Campioni di tessuto ... 70

2.2.2 Immunoistochimica ... 71

2.2.3 Analisi statistica ... 73

2.4 Risultati ... 73

2.4.1 Informazioni cliniche ... 73

2.4.2 Valutazione immunoistochimica ... 74

2.3 Discussione ... 79

Bibliografia ... 84

INTRODUZIONE

Rispetto al melanoma cutaneo, il melanoma primitivo della cavità orale (POM) è relativamente raro ma presenta un decorso naturale più aggressivo ed una prognosi peggiore. La malignità del tumore è altamente correlata con la proliferazione di nuovi vasi. Il Fattore di Crescita Endoteliale Vascolare (VEGF), controllato dal Fattore-1α Indotto dall'Ipossia (HIF-1α), esercita una importante azione biologica sulle cellule endoteliali. Il nostro scopo era quello di indagare l'espressione immunoistochimica di VEGF, HIF-1α e CD34 (Densità Microvascolare, MVD) in 16 POM in confronto con 30 melanomi cutanei. Nei POM la densità microvascolare era significativamente aumentata nel fronte invasivo rispetto al compartimento intratumorale ($p=0.0009$) e i vasi del fronte invasivo mostravano un incremento significativo dell'espressione di VEGF e HIF-1α rispetto a quelli intratumorali ($p=0.043$). L'espressione di VEGF e HIF-1α era simile sia nei melanociti tumorali nel fronte invasivo che all'interno della lesione. A differenza dei POM, i melanomi cutanei non presentavano alcuna differenza significativa nell'espressione di MVD, VEGF e HIF-1α tra il centro e i margini invasivi del tumore. I differenti pattern di espressione potrebbero implicare differenze biologiche reali del melanoma orale rispetto al melanoma cutaneo e sottolineano l'importanza dei margini invasivi nella biologia del POM e nella sua scarsa prognosi. L'elevata attività angiogenica e l'alta espressione di VEGF e HIF-1α da noi riscontrata nel fronte invasivo del melanoma della mucosa orale potrebbero avere importanti implicazioni per la progettazione di trial clinici con agenti mirati contro la via del VEGF. Sono necessari studi più ampi per supportare i nostri risultati.

PARTE 1: IL MELANOMA

1.1 Definizione ed Epidemiologia

Il melanoma è un tumore maligno che deriva dalla trasformazione neoplastica dei melanociti (1) e pertanto può presentarsi ovunque siano presenti queste cellule. I melanociti sono cellule di origine neuroectodermica, situate nello strato basale dell'epidermide deputate alla sintesi della melanina. La melanina è sintetizzata tramite ossidazione della tirosina a 3,4-diidrossifenilalanina (DOPA) ad opera della tirosinasi e dalla successiva trasformazione del DOPA nel prodotto finale. La melanina viene raccolta in granuli detti melanosomi che vengono poi ceduti ai cheratinociti dello strato basale e spinoso tramite i prolungamenti dendritici di cui il melanocita è dotato. In questo modo i pigmenti di melanina formano uno scudo in grado di assorbire e riflettere le radiazioni ultraviolette ionizzanti, proteggendo così le cellule da danni diretti al DNA. Il tipo più frequente di melanoma è quello cutaneo, ma i melanomi possono insorgere anche a livello mucoso, uveale o meningeo.

L'incidenza del melanoma è maggiore nella razza caucasica e circa l'85% dei melanomi cutanei che insorgono ogni anno si registrano in Nord-America, Europa e Oceania (2). In particolare, l'Australia e la Nuova Zelanda risultano i paesi con la più alta incidenza (circa 35 casi/anno ogni 100.000 abitanti) (3) e ciò è dovuto alla presenza di una popolazione con fototipo estremamente chiaro che vive in zone con un'alta irradiazione di raggi UV. L'esposizione solare rappresenta infatti un fattore di rischio per lo sviluppo del melanoma ed anche per questo motivo l'incidenza di questa neoplasia correla con la latitudine.

Si tratta di uno dei principali tumori che insorge in giovane età e il rischio che si sviluppi è pari a 1:66 nei maschi e 1:85 nelle donne. In Italia rappresenta il secondo tumore per incidenza nei maschi con età inferiore

ai 50 anni e il terzo più frequente nelle donne con età inferiore ai 50 anni. La diagnosi avviene in genere nella quinta decade. Il trend di incidenza è in aumento sia nei maschi (+ 4.4% per anno) sia nelle donne (+ 3.1% per anno) a causa soprattutto di comportamenti errati come l'esposizione solare prolungata e incontrollata o l'utilizzo di fonti artificiali UV. È soprattutto l'incidenza di melanomi sottili ad essere in aumento, mentre quella dei melanomi spessi, che influiscono maggiormente sulla mortalità, resta stabile. In Italia si nota la presenza di un gradiente decrescente Nord-Sud per quanto riguarda l'incidenza del melanoma: i tassi di incidenza al Centro-Nord sono fino a due volte più alti rispetto a quelli del Sud.

Il melanoma rappresenta circa il 4% di tutti i tumori cutanei diagnosticati negli Stati Uniti d'America, ma è sicuramente la neoplasia cutanea con il più alto tasso di tasso di mortalità (75%). In Italia rappresenta circa l'1% di tutti i decessi per neoplasia in entrambi i sessi (4) e, nonostante l'aumento dell'incidenza, la mortalità è rimasta stabile. Questo è spiegabile con un aumento delle diagnosi precoci che portano dunque ad un miglioramento della prognosi (5).

1.2 Fattori di Rischio

Il rischio di sviluppare un melanoma dipende da vari fattori che possono essere genetici, ambientali o comportamentali.

1) Esposizione solare → l'esposizione solare intermittente e prolungata rappresenta il principale fattore di rischio per lo sviluppo del melanoma, soprattutto nelle popolazioni caucasiche. Il rischio aumenta nel caso in cui l'esposizione sia avvenuta in età infantile/adolescenziale, in caso di pregresse ustioni solari e di esposizione a fonti artificiali di raggi UV, specie se avvenute prima dei 35 anni (6) (7) (8). La radiazione UV contribuisce alla iniziazione, progressione e metastasi del melanoma grazie alle sue proprietà

infiammatorie, immunosoppressive, cancerogeniche e di danno al DNA (9) (10). Le radiazioni UVB (280 – 320 nm) esplicano un danno diretto al DNA mentre le radiazioni UVA (320 – 400 nm) procurano un danno indiretto al DNA tramite la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Chiaramente l'insorgenza di melanomi a livello del palmo delle mani e della pianta dei piedi, nonché delle mucose, che evidentemente non sono legati direttamente all'esposizione solare, consente di confermare che non tutti i melanomi possiedono gli stessi stimoli patogenetici.

2) Fenotipo → pelle chiara, capelli biondi o rossi, occhi verdi o blu, presenza di numerose lentiggini, tendenza a presentare scottature dopo l'esposizione solare e fototipo I-II presentano un rischio doppio o triplo di sviluppare il melanoma (6) (11). Il pigmento melaninico in questi individui è presente in minor quantità e quindi offre una minore protezione nei confronti delle radiazioni ultraviolette.

3) Presenza di Nevi Melanocitici → la presenza di numerosi nevi, sia tipici che atipici, o la presenza di nevi congeniti rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo del melanoma (12) (6). Tuttavia, il rischio di trasformazione neoplastica di un nevo comune è estremamente basso visto che in circa i tre quarti dei casi il melanoma insorge de novo. La presenza di un solo nevo displasico raddoppia la probabilità di sviluppare la neoplasia (13). I nevi congeniti rappresentano un rischio soprattutto se sono giganti (con dimensione maggiore di 20 cm) (14) (15). In questi casi si cerca di eseguire una escissione precoce per prevenire lo sviluppo della patologia che in questi soggetti si sviluppa in giovane età e presenta una mortalità maggiore.

4) Storia Familiare e Personale → i pazienti a cui viene diagnosticato un melanoma dovranno seguire per tutta la vita un programma di screening adeguato in quanto presentano un rischio dieci volte maggiore rispetto alla popolazione generale di sviluppare un secondo melanoma. I familiari di pazienti affetti hanno un rischio raddoppiato, mentre la presenza di 3 o più parenti di primo grado affetti aumenta il rischio di 35-70 volte (16). Ciò è dovuto sia a fattori di rischio comuni tra i membri della stessa famiglia (esposizione

solare eccessiva, fototipo chiaro, presenza di nevi multipli), ma in circa il 20% di questi casi familiari si riscontra una suscettibilità genetica. Quindi in generale circa il 2% dei melanomi è causato da mutazioni genetiche ereditate in geni che aumentano il rischio di sviluppare la neoplasia. Nei pazienti affetti da melanoma familiare le lesioni si presentano ad un'età più giovane e sono comuni lesioni primarie multiple. I pazienti affetti da melanoma familiare presentano anche un aumentato rischio per tumori pancreatici o del sistema nervoso centrale (17). Mutazioni ereditate in CDKN2A, CDK4, POT1 e TERT conferiscono un rischio di sviluppare un melanoma nel corso della vita che va dal 60% al 90%.

5) Altro → esposizioni lavorative a derivati del petrolio e benzene sembrano presentare una correlazione con lo sviluppo del melanoma (18) (19). Residenti in aree prossime ad industrie con emissione di inquinanti ambientali (acciaierie, centrali elettriche, raffinerie, industrie chimiche, etc.) presentano un notevole aumento incidenza di melanoma (+24% uomini e +14% donne) (20) (21). Anche la dieta sembra influenzare l'incidenza del melanoma con alcuni alimenti che tendono a ridurla (caffè, tè verde, broccoli, pomodori) ed altri che tendono ad aumentarla (pompelmo) (22).

1.3 Genetica

Sono state identificate varie mutazioni genetiche nel DNA che permettono la progressione tumorale del melanoma. Tali mutazioni agiscono prevalentemente tramite due vie, quella delle MAP chinasi e quella della PI3K. I geni mutati o amplificati determinano una maggiore attivazione di oncogeni che favoriscono la

proliferazione e la crescita cellulare ed un'inibizione di geni oncosoppressori causando una resistenza della cellula ai meccanismi di senescenza cellulare e apoptosi.

1.3.1 Via delle MAPK

Il pathway delle MAP chinasi determina l'attivazione di geni che portano alla proliferazione cellulare ed è la via principale di trasduzione del segnale coinvolta nella patogenesi del melanoma (23). La cascata si innesca con il legame di un ligando (ad esempio un fattore di crescita) a livello recettoriale sul versante extracellulare di un recettore tirosin-chinasico. Questo causa la dimerizzazione del recettore e la sua autofosforilazione portando all'attivazione del recettore stesso. Il recettore lega poi la proteina adattatrice Gbr2 che lega e attiva la proteina SOS attivando RAS. RAS a sua volta lega RAF che fosforila e attiva MEK portando all'attivazione di ERK che favorisce la progressione della cellula nel ciclo cellulare e la sua sopravvivenza (24). Nell' 80% dei melanomi primitivi il pathway delle MAPK è risultato attivato in maniera aberrante e le mutazioni responsabili di questa costante attivazione sono risultate principalmente a carico di BRAF / NRAS / C-KIT / GNAQ tra loro mutualmente esclusive. La via delle MAPK inoltre inibisce l'apoptosi per down-regulation della proteina pro-apoptotica BIM (parte della famiglia di BCL-2) (25).

1.3.2 Via PI3K – AKT3

È il secondo pathway più importante per la patogenesi del melanoma (24). PI3K è una chinasi che fosforila PIP2 in PIP3 determinando un'attivazione di AKT (l'isoforma AKT3 in particolare nel melanoma) e di conseguenza un'attivazione del suo substrato mTOR che modula la sintesi di proteine implicate nella crescita cellulare, nella sopravvivenza e nell'apoptosi (26). La proteina PTEN normalmente defosforila PIP3 inibendo il pathway PI3K-AKT. L'attivazione anomala e continua di PI3K nel melanoma può essere dovuta

ad una eccessiva attivazione di NRAS, ad una perdita di funzione di NF1 che regola negativamente RAS, ad una mutazione o amplificazione di C-KIT, ad una mutazione di AKT3 o ad una perdita di funzione di PTEN (27). L'attivazione di AKT promuove la proliferazione cellulare e inibisce l'apoptosi per inattivazione di proteine ad attività pro-apoptotica.

1.3.3 BRAF

È un membro della famiglia delle chinasi RAF che partecipano alla cascata di trasduzione del segnale delle MAPK. Nei melanociti BRAF fosforila e attiva MEK che a sua volta attiva ERK che rappresenta l'effettore finale del pathway delle MAPK. Mutazioni a BRAF sono state riscontrate in melanomi, gliomi, cancro del colon retto, tumori dell'ovaio, neoplasie polmonari, sarcomi (28). Sono 43 le probabili mutazioni a cui è soggetto BRAF, specialmente a carico degli esoni 11 e 15. Nel 40-60% dei melanomi si riscontra una mutazione a BRAF e nel 90% questa mutazione è dovuta alla sostituzione di una valina con acido glutammico a livello del codone 600 (V600EBRAF) (29) (30) (31) (32) (33). Meno frequentemente, 7-22% dei casi, si ha una sostituzione di una valina con lisina sempre a livello del codone 600 (V600KBRAF). Le mutazioni determinano un incremento della crescita tumorale sia per l'aumentata proliferazione cellulare che per l'aumentata angiogenesi (tramite un incremento di VEGF e MIC-1) (24). V600E regola inoltre l'espressione di IL-8, chemochina pro-infiammatoria, che stimola la crescita tumorale, l'angiogenesi e favorisce lo sviluppo di metastasi. Queste mutazioni però sembrano essere condizione necessaria ma non sufficiente allo sviluppo del melanoma in quanto si presentano anche in nevi comuni (34). Nei nevi melanocitici la mutazione di BRAF provoca un aumento di p16CDKN2A che determina arresto del ciclo cellulare e senescenza cellulare, esplicando quindi un'azione protettiva nei confronti di una proliferazione eccessiva. La più alta frequenza di mutazioni di BRAF è presente nei melanomi insorti su cute esposta in maniera intermittente al sole, senza segni evidenti di danno solare cronico. Ciò si ipotizza sia dovuto al

fatto che la radiazione ultravioletta sia in grado di causare tali mutazioni solo nel caso in cui l'esposizione solare non sia stata tanto prolungata da causare i cambiamenti tissutali tipici dell'esposizione solare cronica. Varianti genetiche del recettore MC1R (Melanocortin-1 Receptor) non sono in grado di stimolare adeguatamente la produzione del pigmento melaninico protettivo (35) (36). L'associazione di queste varianti con l'esposizione solare intermittente sembra essere in grado di causare l'attivazione oncogenica di BRAF attraverso un aumento dell'AMP ciclico intracellulare. In caso di mutazione di NRAS (mutualmente esclusiva con BRAF), la trasduzione del segnale mitogeno nell'ambito delle MAPK è dirottato su CRAF (sempre parte della famiglia delle chinasi RAF) che acquisisce un ruolo chiave nella stimolazione della proliferazione cellulare in questo gruppo di melanomi. Un aumento di CRAF è responsabile della resistenza alla terapia con inibitori di BRAF. La mutazione V600E sembra essere correlata con melanomi a diffusione superficiale, cute senza danno solare cronico, localizzazione al tronco e agli arti, presenza di numerosi nevi melanocitici, età giovane alla diagnosi del melanoma primitivo e tendenza a dare precoci metastasi linfonodali.

1.3.4 NRAS

Gene mutato ne 15-25% dei melanomi, più frequentemente tramite la sostituzione di glutammina in posizione 61 con arginina, lisina o leucina (37) (38). Questa mutazione rende la molecola sempre attiva a causa del legame con GTP che diventa stabile. Rappresenta la seconda mutazione per frequenza dopo BRAF, il gene codifica per la proteina NRAS parte della famiglia delle proteine RAS, piccole proteine G che legano GTP/GDP. RAS si attiva in risposta alla stimolazione della cellula con fattori di crescita e ciò comporta la fosforilazione di GDP in GTP e quindi l'attivazione di RAS con stimolazione di fattori a valle che incrementano la proliferazione cellulare. In particolare, RAS può attivare sia la via delle MAPK che quella della PI3K impedendo l'instaurarsi della senescenza cellulare. L'attività di RAS è regolata sia da

fattori di scambio nucleotidico (GEF) che da proteine attivanti le GTPasi (GAP). GEF attivano RAS scambiando GDP con GTP mentre GAP funge da freno favorendo l'idrolisi del GTP inattivando RAS. Mutazioni di RAS o di recettori a monte determinano una attivazione costante di RAS e quindi uno stimolo inappropriato alla crescita cellulare. Le più frequenti mutazioni di RAS interessano il codone 61 e determinano una riduzione dell'attività GTPasica e quindi maggiore attivazione. Le mutazioni a livello dei codoni 12 e 13 causano una insensibilità di RAS all'azione inibitoria di GAP e quindi determinano anche queste una maggiore attivazione (39). Le mutazioni di NRAS sono mutualmente esclusive con quelle di BRAF (40). Queste mutazioni insorgono nella fase precoce del processo cancerogenico ma non sembrano in grado di determinare da sole la trasformazione tumorale. La perdita o inattivazioni di NF1, oncosoppressore parte delle RAS-GAD, determina una attivazione costante dei RAS per l'inibizione dell'idrolisi di GTP a GDP.

1.3.5 C-KIT

C-KIT è un recettore tirosin-chinasico per lo Stem Cell Factor (SCF) che regola la migrazione e la sopravvivenza cellulare nei melanociti. Il legame di SCF causa l'attivazione sia della via di trasduzione di segnale delle MAPK che quella della PI3K incrementando la proliferazione, sopravvivenza e migrazione cellulare (41). C-KIT è mutato in melanomi, tumori stromali gastrointestinali (GIST) e leucemie mieloidi acute. Si possono avere mutazioni puntiformi, delezioni o amplificazioni. Le mutazioni più frequenti sono quelle a livello del dominio chinasico o transmembrana del recettore che innescano un'attivazione costitutiva anche senza la presenza del legando SCF. Solo l'1-7% dei melanomi presenta una mutazione di C-KIT ma la mutazione è più frequente in caso di melanomi acrali (11-25%) o mucosali (10-21%) (42) (43) (44). I melanomi con mutazioni di C-KIT sono caratterizzati da un'avanzata età alla diagnosi, prognosi peggiore e minore sopravvivenza.

1.3.6 GNAQ / GNA11

GNAQ e GNA11 sono geni che codificano per 2 membri della famiglia delle subunità Gα delle proteine G. La mutazione di questi geni è riscontrata di rado nei melanomi ma è molto frequente nei melanomi uveali (GNAQ mutato nel 45% dei casi e GNA11 mutato nel 32% dei casi) (45) (46). Queste mutazioni rappresentano una tappa precoce nella cancerogenesi melanocitaria in quanto si riscontrano in lesioni a rischio di trasformazione maligna. Ad esempio, si riscontrano mutazioni di GNAQ e GNA11 in nevi blu benigni (53-83% e 0-7% rispettivamente) e in nevi blu maligni ovvero su melanomi insorti su nevi blu (17-50% e 17% rispettivamente) (45) (46). Le mutazioni determinano una perdita dell'attività GTPasica, con conseguente costante attivazione della proteina e stimolazione della via delle MAPK.

1.3.7 NF1

Il gene NF1 è un gene oncosoppressore che codifica per la proteina neurofibromina 1. È una RAS-GAP cioè una proteina attivante l'attività GTPasica di RAS che stimola l'idrolisi di GTP in GDP e l'inattivazione di RAS. Il gene NF1 È implicato nella patogenesi della neurofibromatosi 1, ma si è visto che risulta mutato con perdita di funzione nel 15% dei melanomi (47) (48) (49). La perdita di funzione di NF1 porta ad un'attivazione costante di RAS e quindi all'attivazione della via delle MAPK e della PI3K con stimolo alla proliferazione cellulare (27). La mutazione di NF1 non permette l'attivazione del meccanismo di senescenza programmata innescato dell'attivazione inappropriata di MAPK nei melanociti con mutazioni di BRAF o NRAS. Mutazioni di NF1 sono però anche presenti con elevata frequenza in melanomi senza mutazioni di BRAF o NRAS. I melanomi con mutazione di NF1 tendono ad avere un'insorgenza in età più avanzata e mutazioni di NF1 sono molto frequenti nel melanoma desmoplastico (93%) (49).

1.3.8 PTEN

PTEN è un gene oncosoppressore che codifica per una fosfatasi coinvolta nella via di trasduzione del segnale PI3K – AKT. PTEN defosforila PIP3 in PIP2 bloccando l'attivazione di AKT e quindi delle vie a valle di questa. Si possono avere mutazioni o delezioni di PTEN. Le mutazioni causano la produzione di proteina non funzionante mentre le delezioni provocano la perdita completa della proteina. In entrambi i casi si ha un incremento di PIP3 e una attivazione costitutiva di PI3K-AKT che stimola la proliferazione e sopravvivenza cellulare (50). Mutazioni del gene PTEN oltre che nel melanoma si riscontrano in carcinomi della prostata e della mammella. Nel melanoma l'alterazione di PTEN è mutualmente esclusiva con quella di NRAS e si riscontra nel 10-30% dei melanomi, soprattutto in quelli BRAF-mutati (51).

1.3.9 MITF

MITF è un gene che codifica per il fattore di trascrizione associato alla microftalmia (MITF) che ha un ruolo nella omeostasi melanocitaria e promuove la trascrizione di diversi geni necessari per lo sviluppo, la differenziazione, funzione e sopravvivenza dei melanociti (52). Una mutazione di MITF è riscontrata nel 5-20% dei melanomi (52). Determinate mutazioni germinali di MITF conferiscono una predisposizione genetica allo sviluppo di melanomi multipli e aumentano il rischio di sviluppare altre neoplasie primitive, come i carcinomi renali, in pazienti con melanoma e viceversa melanoma, in pazienti affetti da carcinoma renale (52). I pazienti che presentano melanomi con mutazione di MITF presentano una ridotta sopravvivenza a cinque anni.

1.3.10 CDKN2A

Il 20 - 40% dei melanomi ereditari presenta una mutazione germinale del gene oncosoppressore CDKN2A a livello del cromosoma 9p21. Questo gene è un regolatore del ciclo cellulare. La presenza di questa mutazione aumenta la probabilità di sviluppare la neoplasia nel corso della vita che diviene del 76% negli USA, del 91% in Australia e del 58% nel Regno Unito (11). Il 15% dei pazienti con questa mutazione svilupperà un cancro pancreatico (18). CDKN2A codifica per due prodotti: p16 (anche conosciuta come INK4a, inibitore della chinasi 4a) e p14ARF (Alternative Reading Frame). P16 è un regolatore del ciclo cellulare che lega ed inibisce la chinasi ciclina-dipendente Cdk4 e Cdk6, inibendo quindi la progressione della cellula attraverso la fase G1 del ciclo cellulare. Se la funzione di p16 è assente o inibita a causa di una mutazione, l'attività incontrollata di Cdk4 fosforila la proteina del retinoblastoma (RB) rilasciando il fattore di trascrizione E2F ed inducendo quindi l'ingresso nella fase S del ciclo cellulare. Tutto questo determina un incremento della proliferazione cellulare che in assenza di punti di regolazione provoca crescita incontrollata e trasformazione neoplastica. La p14ARF inibisce l'oncogene MDM2 che accelera la distruzione dell'oncosoppressore p53 (19). Una riduzione di p53 può essere dovuta quindi sia ad una mutazione di p14, sia ad un'aumentata espressione di MDM2 che ad un silenziamento del gene TP53.

1.3.11 MC1R

I polimorfismi del gene del recettore della melanocortina 1 (MC1R) rappresentano un fattore di rischio moderato per il melanoma ereditario. Le radiazioni UV stimolano la produzione di melanocortina che è ligando di MC1R che è un recettore accoppiato alle proteine G e attraverso la via dell'AMP ciclico regola la quantità ed il tipo di pigmento prodotto. MC1R è molto polimorfo e tra le varianti alcune portano alla produzione di feomelanina rossa/gialla che non è protettiva e produce un fototipo con capelli rossi, pelle chiara, lentiggini. Questi soggetti presentano un aumentato rischio di sviluppare il melanoma e si è visto che

l’aumentata produzione di feomelanina rappresenta anche un fattore di rischio indipendente dall’esposizione alle radiazioni UV perché causa un maggior stress ossidativo e ed una minor efficienza dei meccanismi riparativi dei danni al DNA.

1.3.12 Altri geni

Il 9% dei pazienti con melanoma ereditario presenta mutazioni a POT1 e TERT che quando funzionano normalmente contribuiscono alla protezione del cromosoma (11). Un’aumentata attività di TERT può portare ad una divisione cellulare incontrollata e promuovere la progressione cancerogenica. Mutazioni a livello di TERT e MITF sembrano predisporre sia al melanoma sporadico che familiare.

1.4 Prevenzione

Tramite misure di prevenzione primaria è possibile ridurre il rischio di sviluppare il melanoma. Queste misure si basano essenzialmente sulla protezione dall’eccessiva esposizione alle radiazioni ultraviolette e consistono nell’utilizzo di filtri solari e indumenti protettivi, nell’evitare di esporsi al sole nelle ore centrali della giornata, nell’evitare ustioni dovute a esposizioni solari prolungate e nell’evitare l’utilizzo di lettini solari abbronzanti.

Gli interventi di prevenzione secondaria permettono invece una diagnosi precoce e quindi una migliore prognosi. Alcune misure sono rivolte alla popolazione generale come informare i pazienti sulle caratteristiche cliniche del melanoma in modo tale da riconoscere precocemente qualsiasi cambiamento di

una lesione pigmentata. Utili sono i criteri di malignità A (asimmetria), B (bordi irregolari), C (colore disomogeneo), D (diametro superiore ai 6 mm) ed E (estensione in superficie o evoluzione).

Lo screening con esame clinico dermatologico, associato all'eventuale osservazione delle lesioni tramite dermatoscopio deve essere effettuato con regolarità soprattutto da pazienti che presentano fattori di rischio. Nei pazienti ad alto rischio di melanoma con numerosi nevi melanociti può essere preso in considerazione l'utilizzo delle Total Body Photography (TBP) che crea un archivio di tutta la superficie cutanea e aiuta il dermatologo nell'identificare nuove lesioni o cambiamenti in quelle preesistenti. In caso di melanoma multiplo o importante familiarità per melanoma dovrebbe essere preso in considerazione il test genetico per la valutazione dello stato mutazionale di CDKN2A o un test genetico multigenico.

1.5 Diagnosi

La diagnosi precoce del melanoma rappresenta un fattore importantissimo per migliorare la prognosi del paziente. Questo perché con il passare del tempo la lesione tende ad infiltrare e a dare metastasi. La diagnosi clinica di melanoma è generalmente difficoltosa ed è condizionata indirettamente dall'esperienza del clinico.

1.5.1 Esame Clinico

È importante effettuare inizialmente un'accurata anamnesi per evidenziare la presenza di comportamenti che aumentano il rischio (pattern di esposizione solare, uso di filtri solari), una storia familiare o personale di melanoma, neoplasie maligne cutanee, lesioni precancerose e fototipo. Il melanoma cutaneo solitamente

si presenta senza sintomi, anche se possono essere presenti prurito o dolore. Segue poi l'esame clinico durante il quale bisogna esaminare l'intera superficie corporea, incluso lo scalpo, l'occhio esterno/congiuntiva, le mucose più facilmente esplorabili, il palmo delle mani, la pianta dei piedi e le unghie. Si deve prestare particolare attenzione alle aree nascoste e più difficili da indagare in quanto i melanomi insorti in queste zone sono associati a un maggiore spessore alla diagnosi a causa di una diagnosi tardiva (20). È importante che l'esame clinico si svolga in una stanza ben illuminata e l'ausilio di un dermatoscopio dovrebbe essere preso in considerazione per l'osservazione delle lesioni sospette. Per facilitare la diagnosi di melanoma è stato sviluppato il sistema ABCDE da utilizzare durante l'esame clinico (21) (22) (23). Ogni lettera rappresenta una caratteristica da valutare in presenza di una lesione melanocitaria.

- A come asimmetria in quanto le lesioni benigne sono in genere simmetriche;

- B come bordi irregolari mentre la maggior parte dei nevi presentano bordi ben definiti;

- C come variazioni di colore all'interno della stessa lesione in contrasto con il colore uniforme delle lesioni benigne;

- D come diametro maggiore di 6mm;

- E come evoluzione cioè qualsiasi cambiamento in dimensione, colore, forma, elevazione o la presentazione di sintomi nuovi quali prurito, sanguinamento.

Un altro indice clinico utile per il riconoscimento dei melanomi è il segno del "brutto anatroccolo" in quanto i nevi di un determinato individuo presentano tutti le stesse caratteristiche (24). Il brutto anatroccolo

è un nevo con caratteristiche diverse da tutti gli altri nevi dello stesso individuo e quindi presenta una maggiore probabilità di rappresentare una lesione maligna.

Un tipo di melanoma che rappresenta una diagnosi particolarmente difficile è il melanoma nodulare. Questo particolare tipo di melanoma presenta una prognosi infausta a causa della sua rapida crescita e aggressività biologica. Per aiutare nella diagnosi si può utilizzare il sistema EGF che rappresentano le caratteristiche da valutare nel caso di lesioni rilevate sospette (nodulari o papulari) in un paziente anziano. Queste caratteristiche sono la recente insorgenza, la rapida crescita (Growth), la consistenza dura (Firm) e l'elevazione delle lesioni (Elevation).

La diagnosi clinica è effettuabile nel'80-90% dei casi. Ogni lesione clinicamente sospetta chiaramente deve essere biopsata.

1.5.2 Dermatoscopia

La dermatoscopia è una tecnica non invasiva che permette di aumentare la sensibilità dell'esame clinico (25) (26). Questa tecnica consente di visualizzare caratteristiche morfologiche altrimenti non evidenti ad occhio nudo come la microstruttura dell'epidermide, la giunzione dermoepidermica e le papille dermiche. La dermatoscopia digitale permette la conservazione delle immagini dermoscopiche digitali così che si possano effettuare confronti durante le visite successive per evidenziare gli eventuali cambiamenti insorti nel corso del tempo. Sono disponibili anche vari programmi automatizzati di analisi delle immagini al computer, strumenti che incorporano algoritmi di analisi delle immagini che consentono una misurazione oggettiva dei cambiamenti della lesione nel corso del tempo. È stato dimostrato come la dermatoscopia sequenziale digitale migliori la diagnosi precoce in confronto alla dermatoscopia standard. L'uso della Total

Body Photography è di aiuto, specie nei pazienti ad alto rischio con moli nevi melanociti, nel tenere traccia di piccoli cambiamenti delle lesioni melanocitarie

1.5.3 Biopsia

La biopsia viene effettuata per tutte quelle lesioni che vengono considerate sospette all'esame clinico. In genere si effettua una biopsia escissionale con margini di cute sana non superiore ai 2mm e orientata longitudinalmente alla rete linfatica. Ciò per non alterare il tessuto linfatico ed evitare falsi negativi ad una eventuale successiva biopsia del linfonodo sentinella (27). Se il margine è troppo ampio infatti aumentano il numero di falsi negativi alla biopsia del linfonodo sentinella. La biopsia deve essere abbastanza profonda da includere la componente più profonda della lesione e deve coinvolgere quindi il derma e l'ipoderma. In caso di lesione di grandi dimensioni o localizzata a livello del palmo delle mani, della pianta dei piedi, delle dita, del volto o delle orecchie, è concesso effettuare una biopsia incisionale a livello della parte più elevata o più scura della lesione. Non ci sono evidenze che una biopsia incisionale della lesione primaria porti al "seeding" del tessuto e a effetti avversi sulla sopravvivenza del paziente (28).

1.5.4 Istologia

La diagnosi istologica di melanoma si basa sulla valutazione delle diverse caratteristiche citologiche, architetturali ed immunoistochimiche della lesione.

Tra le caratteristiche architetturali maggiori si devono ricordare:

- l’asimmetria dei margini laterali del tumore, da una parte all’altra della zona di invasione dermica, quando questa è presente;

- l’invasione degli strati superficiali, granuloso e corneo, dell’epidermide da parte di cellule tumorali isolate; si tratta del criterio principale di malignità delle forme pagetoidi. Tuttavia, tale distribuzione pagetoide dei melanociti, generalmente considerata diagnostica per il melanoma in situ, si può ritrovare anche in lesioni benigne come i nevi di Spitz e in nevi che insorgono a livello vulvare e acrale.

Dal punto di vista citologico si possono distinguere due aspetti principali delle cellule: il tipo epitelioide, tendenzialmente caratteristico dei melanomi a diffusione superficiale e nodulare; il tipo fusiforme: tendenzialmente caratteristico dei melanomi lentigginosi. Il concetto di atipia citologica è alquanto soggettivo; al contrario, la presenza di mitosi dermiche, talora di aspetto atipico è molto significativa.

L’immunoistochimica può essere d’aiuto nella diagnosi del melanoma, soprattutto nelle neoplasie indifferenziate, con poco o nessun pigmento (melanomi amelanotici), nei tumori a cellule fusate o con diffusione pagetoide. Le proteine S100 e Sox10 sono espresse da quasi tutti i melanomi, ma anche da nevi melanocitici ed altri tipi di tumore. HMB-45 è un anticorpo monoclonale con alta specificità per le cellule del melanoma. Melan-A e MART-1 (antigene del melanoma riconosciuto da cellule T) sono nomi dati indipendentemente allo stesso gene codificante per un antigene di differenziazione melanocitario espresso nella cute e nella retina. Melan-A è ampliamente espresso in lesioni melanocitarie benigne e maligne. È più sensibile di HMB-45 e più specifico di S100 per il melanoma. La ricerca di MiTF (fattore di trascrizione associato alla microftalmia) potrebbe essere utile, specie nei melanomi amelanotici (29). I melanomi desmoplastici esprimono comunemente S100 e S0x10, mentre manca l’espressione degli altri markers come

HMB-45, Melan-A e MiTF (30). Ki67 (Mib-1) può essere usato per valutare l'attività proliferativa della lesione. CD31 e l'anticorpo D240 aiutano a identificare l'invasione vascolare ematica e linfatica.

1.5.5 Test di Laboratorio

L'uso di test ematici non è importante tanto per la diagnosi di melanoma quanto per monitorare il decorso clinico della malattia. Nei pazienti affetti da melanoma è stato riscontrato un incremento di LDH (lattatodeidrogenasi), ma il suo valore come marker di melanoma è discusso (31). S100B nel siero è un po' più specifico di LDH ma manca di sensibilità e per questo viene usato nel follow up clinico come marker addizionale per valutare la progressione tumorale (32). La presenza di anemia microcitica può evocare la possibilità di metastasi intestinali.

1.5.6 Imaging

I pazienti dovrebbero essere valutati attraverso palpazione dei linfonodi per rilevare una diffusione regionale della neoplasia. L'ecografia della cute e dei linfonodi è la metodica non invasiva più sensibile per rilevare piccole metastasi linfonodali ed è molto più sensibile della palpazione manuale (33). Se si trova un nodulo linfatico o un nodulo dermico/sottocutaneo nella regione della lesione primaria, è indicata l'escissione bioptica.

1.5.7 Biopsia del Linfonodo Sentinella

Il linfonodo sentinella è il primo linfonodo drenante il tumore primario. La biopsia del linfonodo sentinella è una potente tecnica stadiativa e prognostica che rappresenta il gold standard per la rilevazione di metastasi linfonodali occulte nel sottogruppo di pazienti in cui è indicata (34).

In una metanalisi di 34 studi è stato rilevato che uno spessore di Breslow minore di 1mm è associato a linfonodo sentinella positivo nel 5.6% dei pazienti (percentuale che aumenta in pazienti più giovani di 40 anni e con spessore tra 0.75 e 1 mm e in melanomi primari ulcerati o con riscontro di mitosi) (35) (36) (37) (38). In pazienti con spessore di Breslow compreso tra 1 e 4 mm il 25.2% presentava il linfonodo sentinella positivo alla biopsia e con spessore di Breslow maggiori di 4 mm il 50% dei pazienti presentava positività alla biopsia del linfonodo sentinella (37) (39). La biopsia è quindi raccomandata in caso di spessore maggiore uguale ad 1 mm o con melanomi tra 0.8-1 mm o più sottili in caso di fattori di rischio aggiuntivi come ulcerazione, regressione > 75%, alto indice mitotico, invasione linfovascolare, specialmente in pazienti giovani (34) (35) (36).

Il tecnezio-99m permette il riconoscimento del linfonodo sentinella in più del 98% dei casi in mani esperte (40). Idealmente la procedura dovrebbe essere svolta contemporaneamente alla escissione locale con ampi margini della lesione primaria per una maggiore accuratezza, tuttavia molto spesso viene effettuata in corso di allargamento. Una volta rimosso il o i linfonodi sentinella, questi devono essere analizzati con tecnica a ematossilina e eosina, spesso combinata con immunoistochimica (S100, HMB-4, Melan-A). L'uso dell'immunoistochimica aumenta la sensibilità per l'individuazione delle metastasi e determina un amento dello stadio nel 10-20% dei pazienti (41). Anche una singola cellula di melanoma all'interno del linfonodo determina una positività (N1a).

1.6 Fattori prognostici

1.6.1 Fattori Prognostici nel melanoma primario

1) Spessore di Breslow: è il singolo fattore più importante per la sopravvivenza ed il management clinico nei melanomi cutanei ed è il fattore che meglio degli altri predice il rischio di metastasi (42). Viene misurato in millimetri dalla cima dello strato granuloso dell'epidermide (o se la lesione è ulcerata dal fondo dell'ulcerazione) fino al punto di massima infiltrazione del tumore (tabella 1). La sopravvivenza decrescere all'aumentare dello spessore. Il livello di Clark è un'alternativa meno accurata per misurare lo spessore in base al livello anatomico invaso e non è usato nello staging del melanoma. A seconda del livello anatomico invaso si distinguono 5 livelli (tabella 2). Il parametro deve comunque essere presente nel referto in quanto è stato dimostrato un suo valore prognostico in melanomi con spessore di Breslow minore di 1 mm.

Tabella 1 Spessore di Breslow secondo AJCC (8° Edizione).

Classificazione	**Spessore di Breslow**
T1	≤ 1,0 mm
T2	> 1,0 – 2,0 mm
T3	> 2,0 – 4,0 mm

T4	> 4,0 mm

Tabella 2 Livello di Clark secondo classificazione AIRTUM.

Livello do Clark	**Tessuto invaso**
I	Limitato all'epidermide
II	Invade il derma papillare
III	Si espande nel derma papillare
IV	Infiltra il derma reticolare
V	Infiltra il sottocute

2) Ulcerazione: correla con lo spessore tumorale, si verifica infrequentemente nei melanomi sottili (meno di 1mm) e frequentemente in quelli spessi (63% in quelli maggiori di 4mm). A parità di spessore di

Breslow, i pazienti che presentano ulcerazione hanno una prognosi peggiore rispetto a quelli senza ulcerazione; rappresenta quindi un fattore prognostico indipendente per i melanomi localizzati (42) (43). La presenza di ulcerazione nella lesione primaria conferisce un rischio aumentato di sviluppare malattia avanzata, una minor tasso di sopravvivenza e aumenta lo stadio della patologia. La peggior prognosi può essere dovuta al fatto che l'ulcerazione indica un melanoma con potenziale biologico differente (44). Melanomi ulcerati tendono ad avere una maggior vascolarizzazione, caratteristiche immunosoppressive, un profilo genetico che differisce dai melanomi non ulcerati ed un aumentato tasso di metastatizzazione linfovascolare, viscerale ed osseo. L'ulcerazione è risultata essere un fattore predittivo indipendente per la terapia adiuvante con interferone, lo stesso è stato visto per la terapia adiuvante con ipilimumab nella malattia in III stadio (44) (45). La sua presenza viene valutata al microscopio ed è definita dalla mancanza dell'epidermide a tutto spessore, incluso lo strato corneo, dalla evidenza di fenomeni reattivi (depositi di fibrina, neutrofili) e dalla iperplasia reattiva o assottigliamento dell'epidermide adiacente in assenza di trauma in anamnesi.

3) Indice mitotico: rappresenta il numero di mitosi per mm2. È valutato nella componente invasiva del melanoma, a partire dall'area con maggiore attività mitotica (hot-spot) ed estendendo la conta ai campi adiacenti per un'area complessiva di 1mm2. Se non vi sono hot-spot e le mitosi sono sparse random nella componente in fase di crescita verticale, si seleziona un campo con una mitosi e si estende la conta ai campi adiacenti per un'area complessiva di 1mm2. Diversi studi hanno riportato l'importanza del tasso mitotico come fattore predittivo indipendente per la sopravvivenza, con un aumentato tasso mitotico che correla con una decrescita della sopravvivenza (46). Tra i pazienti con melanoma clinicamente localizzato, un tasso mitotico di 1/mm2 o maggiore è stato descritto come il secondo più forte predittore di sopravvivenza dopo lo spessore Breslow (42). L'indice mitotico può anche correlare con la positività alla biopsia del linfonodo sentinella, specialmente in pazienti giovani (47).

4) Invasione vascolare: il coinvolgimento vascolare consiste nell'invasione, da parte delle cellule tumorali, della microvascolarizzazione del derma. Alcuni report hanno notato come l'invasione vascolare sia accosciato ad un aumento del rischio di recidiva, coinvolgimento linfonodale, metastasi distali e morte (48) (47).

5) Microsatellitosi: la presenza di microsatellitosi è stata costantemente correlata ad un outcome peggiore e a maggiore probabilità di metastasi a distanza (42) (49). La microsatellitosi è definita come una metastasi microscopica cutanea e/o sottocutanea adiacente o in profondità rispetto al melanoma primitivo. L'aggregato neoplastico deve essere in discontinuità rispetto al melanoma primitivo ma non separato da fibrosi o cellularità infiammatoria, in quanto questi ultimi possono rappresentare presenza di fenomeni di regressione. La prognosi non è diversa da pazienti con macrosatellitosi e non c'è differenza nemmeno tra presenza di satellitosi e metastasi in transit. Satelliti sono metastasi cutanee e/o sottocutanee riconosciute clinicamente localizzate entro 2cm dal melanoma primitivo. Le metastasi in transit sono metastasi dermiche e/o sottocutanee clinicamente evidenti poste a una distanza maggiore di 2cm dal melanoma primitivo, nella regione compresa tra il tumore primitivo e il primo bacino di linfonodi loco regionali.

6) Linfociti infiltranti il tumore: i linfociti infiltranti il melanoma primario rappresentano la risposta immune antitumorale dell'ospite. Nella fase di crescita radiale è presente di solito una vivace risposta dell'ospite, mentre la presenza di linfociti infiltranti il tumore nella fase di crescita verticale del tumore è meno frequente (50). L'infiltrato linfocitario è classificato come vivace o brisk (una banda densa di linfociti tra le cellule tumorali attraverso l'intera base o attraverso il tumore, infiltrato linfocitario a livello del fronte di crescita del tumore o permeazione diffusa del tumore), non vivace o non brisk (pochi e piccoli focolai) o assente (non ci sono linfociti o essi non sono in contatto con le cellule neoplastiche), ed è stata osservata una relazione diretta tra il grado di infiltrazione linfocitaria del tumore e la sopravvivenza (50). Pazienti con

infiltrato linfocitario vivace hanno un minor rischio di recidiva ed una miglior sopravvivenza complessiva in confronto a quelli con infiltrato linfocitario non vivace o assente (51).

7) Tipo istologico di melanoma: non è considerato fattore prognostico indipendente. Alcuni melanomi, come il melanoma nodulare, presentano in genere una prognosi peggiore rispetto ad altri istotipi dovuta al maggior spessore del tumore al momento della diagnosi. A parità di spessore infatti non è presente una differenza prognostica.

8) Fase di crescita: Il melanoma ha una fase di crescita radiale ed una verticale. La fase radiale è quella non tumorigenica, con proliferazione di melanociti nell'epidermide e/o nel derma papillare senza formazione di nodulo tumorale. La fase di crescita verticale è quella tumorigenica in cui il melanoma acquisisce la capacità di metastatizzare ed è caratterizzato dalla formazione di un nodulo espansivo e/o dalla presenza di figure mitotiche nella componente invasiva. Il melanoma nodulare che presenta per definizione un pattern di crescita verticale.

9) Presenza di regressione: può essere parziale o totale e corrisponde ad una fibrosi derivata da una risposta infiammatoria di difesa locale. La sua presenza potrebbe, almeno in alcuni casi, portare ad una determinazione non corretta dello spessore del melanoma e pertanto ad una non corretta valutazione prognostica. In questi casi è più probabile avere una sotto stadiazione della lesione in quanto questa si spingeva più in profondità poi è regredita. Clinicamente la regressione può manifestarsi con un alone irregolare intorno alla lesione. Microscopicamente si presenta nelle fasi iniziali come un denso infiltrato di linfociti, mentre nelle fasi avanzate è presente una cicatrice vascolarizzata e macrofagi contenenti pigmento melanico. Per lesioni molto sottili, con una regressione maggiore del 75%, è consigliabile eseguire comunque la tecnica del linfonodo sentinella.

10) Stato dei margini: indicare se i margini del campione prelevato con la biopsia sono liberi da neoplasia e la distanza minima della neoplasia dai margini del campione. Se i margini non sono ad una adeguata distanza minima dalla neoplasia, è necessario effettuare un secondo intervento per ampliare il margine.

11) Classificazione molecolare: il melanoma cutaneo presenta alta prevalenza di mutazioni somatiche sia nelle lesioni primarie che in misura maggiore nelle metastasi. Circa tre quarti di queste mutazioni sono rappresentate da sostituzioni C>T che risultano essere dipendenti da un effetto mutageno dei raggi UV (cosiddetta UV signature). Nei pazienti con melanomi in stadio III o IV dovrebbe essere presa in considerazione la determinazione dello stato mutazionale di BRAF. Per questa analisi è opportuno utilizzare i tessuti di melanoma metastatico per lo stadio IV mentre per lo stadio III si può utilizzare il campione di melanoma primitivo. A causa dell'eterogeneità intratumorale, se l'analisi effettuata su tessuto primitivo desse come risultato wild-type, si può ripetere l'analisi sulle metastasi accessibili. La mutazione di BRAF-V600 ha significato predittivo per la possibilità di trattare il paziente che presenta questa mutazione con la combinazione di BRAF e MEK inibitori (target therapy). Nei pazienti in stadio IV o in stadio III inoperabile e con assenza di mutazioni BRAF può essere presa in considerazione la determinazione dello stato mutazionale di NRAS per il possibile inserimento del paziente in studi clinici. Nei pazienti con melanoma acrale o mucoso in stadio IV o III inoperabile e in assenza di mutazione BRAF dovrebbe essere presa in considerazione la determinazione dello stato mutazionale di c-KIT per il possibile trattamento del paziente con immunoterapia o, in caso di fallimento o non possibile utilizzo di quest'ultima, con c-KIT inibitori (imatinib).

12) Sesso ed età: le donne hanno un tasso di sopravvivenza migliore rispetto agli uomini e probabilmente ciò è dovuto ad una diagnosi precoce in quanto le donne hanno, più frequentemente rispetto agli uomini, melanoma alle gambe più semplice da riconoscere (42). Gli uomini con più di 60 anni

presentano il più alto tasso di mortalità forse a causa di una diagnosi tardiva (e quindi di un melanoma con spessore di Breslow maggiore) (43). L'età rappresenta un fattore prognostico indipendente forse a causa dell'inefficienza del sistema immunitario con l'avanzare degli anni, si è notato però che pazienti giovani presentano maggiore rischio di metastasi linfonodali (44).

1.6.2 Fattori prognostici nelle metastasi regionali

Lo stato dei linfonodi regionali è il fattore prognostico più potente per la sopravvivenza nel melanoma, in quanto la presenza di metastasi linfonodali correla con una prognosi peggiore. Il numero di linfonodi coinvolti, indipendentemente dalla dimensione della metastasi, è il fattore di rischio più importante nei pazienti con melanomi in III stadio (42). Il secondo fattore di rischio più importante è il margine del tumore, stratificato in malattia micro-metastatica (determinata tramite biopsia linfonodo sentinella) o malattia macro-metastatica (linfonodi clinicamente palpabili). In pazienti di stadio I o II con linfonodi clinicamente negativi, lo stato del linfonodo sentinella è il fattore prognostico più importante per la sopravvivenza liberi da malattia (54) (55). Perciò la biopsia del linfonodo sentinella per la ricerca di micro-metastasi, è diventato uno standard per pazienti con melanomi con spessore di Breslow ≥ 1 mm o per melanomi più sottili ma con fattori di rischio addizionali come l'ulcerazione, la regressione > 75%, un alto tasso mitotico o invasione linfovascolare, specialmente in pazienti giovani. L'ulcerazione della lesione primaria indica una prognosi peggiore nella malattia regionale di III stadio. Il tasso mitotico della lesione primaria correla fortemente con una prognosi peggiore nella malattia microscopica regionale di III stadio. Metastasi satellitari, cliniche e microscopiche, attorno al melanoma primario e metastasi in transit tra la lesione primaria e il linfonodo, rappresenta la malattia intralinfonodale e porta la peggior prognosi per metastasi regionali, con una sopravvivenza a 5 anni minore del 50% (42).

1.6.3 Fattori prognostici nelle metastasi distali

La presenza di metastasi distali è associata con la prognosi peggiore, con sopravvivenza media misurata in mesi piuttosto che anni, almeno fino ad alcuni anni fa. Il sito della metastasi rappresenta un importante fattore prognostico, le metastasi a livello viscerale presentano una prognosi peggiore rispetto a quelle in sedi non viscerali (pelle, tessuto sottocutaneo, linfonodi distali) (42). Altre variabili prognostiche sono il numero di siti di metastasi e la loro resecabilità chirurgica. Elevati livelli di LDH sono associati a prognosi peggiore indipendentemente dal sito del melanoma metastatico.

1.7 Stadiazione

Una volta fatta la diagnosi di melanoma, il tumore viene stadiato per determinare la prognosi ed il trattamento più adeguato. Esistono due tipi di stadiazione. La stadiazione clinica include la valutazione microscopica della lesione cutanea e la valutazione clinico/radiologica delle metastasi. La stadiazione patologica include anche la valutazione microscopica dei linfonodi sentinella e/o dei linfonodi escissi tramite linfoadenectomia. I pazienti in stadio patologico 0 o IA sono l'eccezione e non richiedono la valutazione patologica dei linfonodi. Il melanoma può progredire a differenti stadi della malattia, iniziando come primaria (I/II), poi metastasi regionali (III) e metastasi a distanza (IV). In generale la prognosi e la sopravvivenza peggiorano all'aumentare dello stadio. All'inizio circa l'85% dei pazienti ha malattia localizzata, 10% metastasi locoregionali e 5% metastasi distali (42).

1.7.1 Stadi I e II

In generale, la sopravvivenza a 5 e 10 anni per pazienti con melanoma primario localizzato sottile, con spessore Breslow minore di 1mm, è maggiore del 90%. La maggior parte delle recidive si manifesta nei primi cinque anni successivi alla diagnosi e trattamento, in base allo spessore del tumore ed altri fattori prognostici della lesione primaria. Però il melanoma può recidivare in ogni momento, e l'incidenza di recidiva tardiva a 10 o più anni dopo la diagnosi iniziale va dal 1 al 5% (43).

1.7.2 Stadio III

Rappresenta un amplio range di pazienti con outcome clinico variegato, da pazienti con malattia linfonodale microscopica (IIIA) a pazienti con linfonodi clinicamente voluminosi o metastasi in-transito (IIIC). La sopravvivenza a 5 anni va dal 38 al 78%, prevalentemente dovuta a differenti variabili come il numero dei linfonodi positivi (la più variabile più importante), il carico del tumore nel linfonodo (microscopico o macroscopico), l'età, la presenza di ulcerazione, lo spessore di Breslow della lesione primaria (42). C'è un significativo declino della sopravvivenza nei pazienti che si presentano con malattia metastatica linfonodale clinicamente evidente rispetto a quelli con malattia microscopica evidenziata tramite biopsia.

1.7.3 Stadio IV

È rappresentato dal melanoma metastatico. La neoplasia, infatti, può dare metastasi a distanza sia a livello viscerale che non. I siti non viscerali come cute/sottocute distale, linfonodi distali, sono coinvolti in circa metà degli stadi IV (42 al 57%). I siti viscerali più comunemente invasi da metastasi sono invece i polmoni (18-36%), il fegato (14-20%), l'encefalo (12-20%), le ossa (11-17%) e il tratto gastrointestinale (1-7%).

Una volta rilevata la presenza di metastasi distali, la sopravvivenza media in assenza di trattamento è tra i 6 e 9 mesi. Con la target therapy e l'immunoterapia la sopravvivenza può arrivare a 2 anni e si può ottenere anche un controllo a lungo termine del tumore (44) (45).

1.7.4 Melanoma metastatico da lesione primaria sconosciuta

È definito come la presenza confermata istologicamente di melanoma in un linfonodo, un sito viscerale o cute/tessuto sottocutaneo distale senza storia o evidenza di una lesione primaria cutanea, mucosa o oculare di melanoma. Questa situazione si presenta nel 2-5% dei casi. Circa il 60% di questi casi coinvolge i linfonodi e potrebbe essersi sviluppata da un nevo linfonodale (46). I restanti coinvolgono siti distali, tipicamente cute o tessuto sottocutaneo e meno comunemente polmoni, encefalo o tratto gastrointestinale. Il melanoma metastatico da lesione primaria sconosciuta ha tassi di sopravvivenza simili ai melanomi primari di medesimo stadio. Il melanoma metastatico da lesione primaria sconosciuta ai linfonodi ha una sopravvivenza a 5-10 anni del 46 e 41%, simile a quella del tumore primario di terzo stadio, mentre quello metastatico ai visceri ha una sopravvivenza media di 6 mesi (47) (48). Lo studio del melanoma metastatico da lesione primaria sconosciuta dovrebbe includere un esame completo della cute per la ricerca del sito primario. La lampada di Wood potrebbe essere usata per identificare aree ipopigmentate subcliniche che potrebbero essere suggestive di regressione del tumore primario. Nel melanoma metastatico da lesione primaria sconosciuta ai linfonodi dovrebbe essere posta particolare attenzione a quelle aree che drenano in quel distretto linfonodale coinvolto. Dovrebbe essere svolta una completa revisione delle lesioni precedentemente asportate nel soggetto. Se giustificato il paziente dovrebbe essere sottoposto a esami proctoscopici, ginecologici, oculari, e della mucosa nasale. Comunque, solo raramente un tumore primario viene identificato, perciò procedure invasive come gastroscopia o colonscopia dovrebbero essere evitate in

assenza di indizi per la presenza di melanoma in queste zone. L'iter di stadiazione ed il trattamento devono essere svolti come per la lesione primaria di stesso stadio.

1.7.5 La classificazione AJCC

Una stadiazione accurata è la base per la prognosi ed il trattamento. L'American Joint committee on cancer (AJCC) ha pubblicato nel 2017 una revisione del sistema di stadiazione del melanoma ottenuto da dati provenienti da più di 46000 pazienti in 10 centri a livello mondiale (42) (49) (50). La dimensione del tumore, lo stato linfonodale e la presenza di metastasi (TNM) continuano ad essere la colonna portante del sistema di stadiazione. T rappresenta l'estensione o lo spessore della lesione primaria, N l'estensione delle metastasi linfonodale (linfonodi loco regionali), M indica l'estensione delle metastasi a distanza.

Tabella 1. Stadiazione del melanoma secondo AJCC (8° Edizione)

Categoria T	***Spessore di Breslow^***	***Ulcerazione***
T1 ≦ 1,0 mm		
T1a	a: <0,8 mm	Assente
T1b	b: <0,8 mm	Presente
	0,8-1,0 mm	Assente/Presente
T2 >1,0-2,0 mm		
T2a	a: >1,0-2,0 mm	Assente
T2b	b: >1,0-2,0 mm	Presente
T3 >2,0-4,0 mm		
T3a	a: >2,0-4.0 mm	Assente
T3b	b: >2,0-4.0 mm	Presente
T4 > 4,0 mm		
T4a	a: > 4,0 mm	Assente
T4b	b: > 4,0 mm	Presente
Categoria N^^	***N° di linfonodi regionali coinvolti***	***Metastasi in-transit, satelliti, e/o microsatellitosi*** ^^^

N1	1 linfonodo coinvolto oppure metastasi in-transit, satelliti, e/o microsatellitosi in assenza di linfonodi regionali coinvolti	
N1a	a: 1 linfonodo clinicamente occulto (diagnosticato con biopsia del linfonodo sentinella)	a: Assenti
N1b	b: 1 linfonodo dimostrato clinicamente	b: Assenti
N1c	c: Linfonodi regionali non coinvolti	c: Presenti
N2	2-3 linfonodi coinvolti oppure metastasi in-transit, satelliti, e/o microsatellitosi con 1 linfonodo regionale coinvolto	
N2a	a: 2 o 3 linfonodi clinicamente occulti (diagnosticati con biopsia del linfonodo sentinella)	a: Assenti
N2b	b: 2 o 3 linfonodi, di cui almeno 1 dimostrato clinicamente	b: Assenti
N2c	c: 1 linfonodo clinicamente occulto o diagnosticato clinicamente	c: Presenti

*Categoria N^^*	*N° di linfonodi regionali coinvolti*	*Metastasi in-transit, satelliti, e/o microsatellitosi ^^^*
N3	4 o più linfonodi coinvolti oppure metastasi in-transit, satelliti, e/o microsatellitosi con 2 o più linfonodi regionali coinvolti oppure qualsiasi numero di pacchetti linfonodali (linfonodi confluenti) con o senza metastasi in transit, satelliti e/o microsatellitosi	
N3a	a: 4 o più linfonodi clinicamente occulti (diagnosticati con biopsia del linfonodo sentinella)	a: Assenti
N3b	b: 4 o più linfonodi, di cui almeno 1 dimostrato clinicamente oppure presenza di pacchetti linfonodali (linfonodi confluenti), in qualsiasi numero	b: Assenti
N3c	c: 2 o più linfonodi clinicamente occulti o diagnosticati clinicamente e/o presenza di pacchetti linfonodali (linfonodi confluenti), in qualsiasi numero	c: Presenti
Sede	***Sede Anatomica***	***LDH***
M1	Evidenza di metastasi a distanza	
M1a	a: Metastasi a distanza alla cute, tessuti molli compreso il muscolo e/o linfonodi non regionali	Non valutato o non specificato
M1a(0)		Non elevato
M1a(1)		Elevato
M1b	b: Metastasi a distanza al polmone con o senza sedi di malattia M1a	Non valutato o non specificato
M1b(0)		Non elevato
M1b(1)		Elevato
M1c	c: Metastasi a distanza a sedi viscerali diverse dal SNC con o senza sedi di malattia M1a oppure M1b	Non valutato o non specificato
M1c(0)		Non elevato
M1c(1)		Elevato
M1d	d: Metastasi a distanza al SNC con o senza sedi di malattia M1a, M1b oppure M1c	Non valutato o non specificato
M1d(0)		Non elevato
M1d(1)		Elevato

^Nella più recente edizione del sistema di Stadiazione AJCC (8° edizione), lo spessore secondo Breslow deve essere arrotondato al decimo di millimetro (0,1 mm) più vicino (ad esempio, melanomi di spessore compreso tra 0,75 e 0,84 devono refertati con spessore pari a 0,8 mm oppure melanomi di spessore compreso tra 0,95 mm e 1,04 mm devono essere refertati con spessore pari a 1,0 mm). Tx indica spessore secondo Breslow non valutabile, T0 indica la condizione di non evidenza di un tumore primario (paziente che si presenta con metastasi linfonodali in assenza di melanoma primitivo riconosciuto) mentre Tis indica un melanoma *in situ.*

^^Non sono più utilizzati i termini “micrometastasi” o “macrometastasi” mentre si fa riferimento a malattia “clinicamente occulta” oppure “documentata clinicamente”. Si sottolinea che il carico di malattia (cosiddetto “*tumor burden*”) nel linfonodo sentinella non è utilizzato per la sottoclassificazione della categoria N.

^^^I satelliti sono definiti come metastasi cutanee e/o sottocutanee riconosciute clinicamente localizzate entro 2 cm dal melanoma primitivo. Le metastasi in transit sono definite come metastasi dermiche e/o sottocutanee clinicamente evidenti poste ad una distanza >2 cm dal melanoma primitivo, nella regione compresa tra il tumore primitivo ed il primo bacino di linfonodi loco-regionali.

Tabella 2 Stadio clinico (cTNM) (AJCC 8° edizione)

T	N	M	cTNM
Tis	N0	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IB
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	IIA
T3b	N0	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
Any T, Tis	≥N1	M0	III
Any T	Any N	M1	IV

Tabella 3 Stadio patologico (pTNM) (AJCC 8° edizione)

T	**N**	**M**	**pTNM**
Tis	N0	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IA
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	IIA
T3b	N0	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
T0	N1b, N1c	M0	IIIB
T0	N2b, N2c, N3b or N2c	M0	IIIC
T1a/b-T2a	N1a or N2a	M0	IIIA
T1a/b-T2a	N1b/c or N2b	M0	IIIB
T2b/T3a	N1a-N2b	M0	IIIB
T1a-T3a	N2c or N3a/b/c	M0	IIIC
T3b/T4a	Any N≥N1	M0	IIIC
T4b	N1a-N2c	M0	IIIC
T4b	N3a/b/c	M0	IIID
Any T, Tis	Any N	M1	IV

1.8 Istopatologia

Dal punto di vista istopatologico si possono distinguere i seguenti tipi di melanoma: melanoma a diffusione superficiale, melanoma nodulare, lentigo maligna, lentigo maligna melanoma, melanoma lentigginoso acrale, melanoma desmoplastico, melanoma mucoso, melanoma nevoide, melanoma Spitzoide e melanoma uveale. Nel melanoma a diffusione superficiale, lentigo-maligna melanoma e melanoma lentigginoso acrale la lesione ha un periodo di crescita superficiale (cosiddetta radiale) durante il quale aumenta di dimensioni ma non penetra in profondità e le cellule non presentano ancora atipie marcate. È durante questa fase che si hanno maggiori chances di curare il paziente attraverso un'escissione chirurgica. Un quarto tipo istologico, il melanoma nodulare, non ha una fase di crescita radiale riconoscibile e generalmente si presenta come una lesione profondamente invasiva capace di dare metastasi precoci. I tumori che iniziano a penetrare in profondità nella pelle si trovano nella cosiddetta fase di crescita verticale. Tale fase è spesso preannunciata dalla comparsa di un nodulo e in questa fase le cellule presentano numerose ed evidenti atipie. I melanomi con fase di crescita radiale sono caratterizzati da bordi irregolari e a volte dentati, variazione nel pattern del pigmento e variazione di colore. Un quinto tipo di melanoma, il melanoma desmoplastico, è associato ad una risposta fibrotica, invasione neurale, e maggiore tendenza alla recidiva locale. Occasionalmente i melanomi possono apparire clinicamente amelanotici, nel qual caso la diagnosi è posta microscopicamente dopo una biopsia. Nonostante questi sottotipi siano clinicamente ed istopatologicamente distinti, questa classificazione ha valore prognostico minimo.

1.8.1 Melanoma a diffusione superficiale

È il più comune sottotipo e rappresenta circa il 70% di tutti i melanomi cutanei. È diagnosticato prevalentemente nelle aree esposte a radiazione UV in maniera intermittente a livello degli arti inferiori nelle donne e della parte alta del dorso negli uomini. La sua espressione clinica è quella che presenta maggiore corrispondenza con i criteri ABCD, con bordi irregolari, asimmetrico, pigmentazione irregolare, ma si può presentare in maniera subdola come un'area focale più scura nel contesto di un preesistente nevo. La colorazione va dal rosso spento al bruno-nerastro. È il sottotipo di melanoma maggiormente associato a nevi preesistenti. La storia di questo melanoma è quella di una lesione che si modifica molto lentamente nel corso di mesi/anni. Dopo mesi/anni assume aspetto più o meno nodulare, ulcerandosi e questo indica che è entrato nella fase di crescita verticale. Istologicamente il segno rilevatore di tale tipo di melanoma è la presenza di melanociti ingrossati, organizzati in piccoli aggregati o nidi, che mostrano marcata disseminazione verso l'alto all'interno dell'epidermide, con un pattern definito pagetoide. Può essere confuso con nevo atipico o cheratosi seborroica.

1.8.2 Melanoma nodulare

È il secondo sottotipo più comune di melanoma e rappresenta il 15-30% di tutti i melanomi. Colpisce prevalentemente maschi attorno ai 50 anni e il tronco è il sito principale. Ha una evoluzione estremamente rapida, spesso sviluppandosi nel corso di qualche settimana/mese. Frequentemente manca di una fase di crescita radiale ed insorge più spesso de novo che da un nevo preesistente. La lesione appare come sollevata, spesso è accompagnata da sanguinamento e ulcerazione e il colore è blu-nero o blu-rosso, ma il 5% dei melanomi nodulari sono amelanotici. Le lesioni precoci spesso mancano di asimmetria, hanno bordi regolari e colore uniforme. Le lesioni amelanotiche possono essere scambiate per carcinoma basocellulare, granuloma piogenico o

emangioma, mentre le lesioni pigmentate possono essere confuse con nevi blu o carcinoma basocellulare pigmentato. Il melanoma a diffusione superficiale e il melanoma nodulare hanno il più alto tasso di mutazione del gene BRAF presente in circa il 56% di queste lesioni (18). È presente un'associazione con nevi melanocitici multipli.

1.8.3 Lentigo maligna e lentigo maligna melanoma

La lentigo maligna è un melanoma in situ con una fase di crescita radiale prolungata, a lento decorso, che quando diventa verticale viene chiamato lentigo maligna melanoma. La lentigo maligna melanoma rappresenta il 10-15% dei melanomi cutanei. Entrambe le lesioni sono spesso diagnosticate nella settima/ottava decade, in popolazione più anziana rispetto ad altri sottotipi di melanoma, è non comune prima dei 40 anni. La localizzazione più frequente è a livello delle aree cronicamente fotoesposte come il volto, a livello delle guance e del naso in particolare, il collo, lo scalpo e le orecchie. La patogenesi si pesa sia dovuta all'esposizione solare cumulativa piuttosto che a quella intermittente. Clinicamente la lesione appare inizialmente piatta, con accrescimento lento, di colore marrone, con macule simili a lentiggini a forma irregolare, sviluppandosi su un background di danno fotoindotto. Entrambe hanno spesso margini clinicamente mal definiti, che potrebbero essere nascosti da un background di danno attinico consistente in lentiggini, efelidi e cheratosi attinica pigmentata. Entrambe sono associate con un tasso significativamente elevato di crescita laterale estensiva subclinica, che porta ad un maggior tasso di recidiva nelle escissioni effettuate con i margini standard raccomandati. Entrambi gli istotipi presentano la più bassa associazione con nevi ma la più alta associazione con melanoma desmoplastico. I melanomi insorti su cute con danno attinico presentano aberrazioni di c-KIT più frequentemente che mutazioni di BRAF (28 vs 6%) (19).

1.8.4 Melanoma lentigginoso acrale

È un sottotipo di melanoma con importanti differenze nella frequenza in diversi gruppi etnici. Rappresenta il 2-8% dei melanomi nella popolazione caucasica ma è il tipo di melanoma più comune tra gli individui con pigmentazione più scura (60-72% dei melanomi negli afroamericani, 29-46% dei melanomi negli asiatici). Nonostante la proporzione di melanoma lentigginoso acrale nelle popolazioni di carnagione scura sia più alta, l'incidenza è simile tra i vari gruppi etnici. È più spesso diagnosticata in popolazione anziana, con età media di 65 anni. Il sito più comune è la pianta dei piedi, seguito dal palmo delle mani e dalla zona sottoungueale. L'espressione clinica è data da una lesione con bordi irregolari e colore dal marrone al nero, ma può essere anche rosso con variegature di colore. Spesso all'inizio le lesioni vengono erroneamente diagnosticate come verruche plantari o ematomi. Questo tipo di melanoma non è associato all'esposizione solare. Il melanoma subungueale viene considerato una variante del melanoma lentigginoso acrale e generalmente si sviluppa dalla matrice ungueale, più frequentemente a livello del primo dito. Si presenta come discolorazione dal marrone al nero, con crescita nel letto ungueale. Può anche essere presente una striscia nera longitudinale, scura o irregolarmente pigmentata che si allarga (melanonichia striata) con o senza distrofia ungueale o una elevazione del letto ungueale. Potrebbero essere ugualmente presenti il segno di Hutchinson e pigmentazione nella piega ungueale prossimale. Alcune lesioni benigne imitano il melanoma subungueale come la melanonichia longitudinale benigna, l'ematoma subungueale, il granuloma piogenico, la onicomicosi con pigmentazione o emorragia. Nel melanoma acrale la mutazione BRAF è la più frequente (21%) seguita da quella a c-KIT (13%) (20).

1.8.5 Melanoma desmoplastico

Si sviluppa più comunemente nella sesta/settima decade nelle regioni fotoesposte della testa e del collo. Le lesioni generalmente hanno una consistenza ferma, sclerotica o indurita e la metà sono amelanotici. Metà delle lesioni si sviluppano in associazione con il sottotipo istologico di lentigo maligna. Nonostante siano spesso profondamente invasive al momento della diagnosi e con una tendenza alla crescita perineurale, sono associati al più alto tasso di recidiva locale e al più basso tasso di metastasi linfonodali rispetto agli altri sottotipi di melanoma a parità di spessore di Breslow. Sono state evidenziate mutazioni di NF1 in oltre il 90% dei casi, mentre non sono state trovate mutazioni di BRAF o NRAS in questo sottotipo di melanomi (21) (22).

1.8.6 Melanoma mucoso

Nel 1.3% dei casi il melanoma può svilupparsi sulle superfici mucose (congiuntive, cavità orale, seni paranasali, mucosa intranasale, genitale, anorettale, uretrale) (23). Con l'eccezione della congiuntiva i pazienti presentano spesso diagnosi tardiva con lesioni profondamente pigmentate, irregolari e spesso con segni di sanguinamento. Ogni area sospetta in questi siti deve essere sottoposta a biopsia in quanto questa lesioni si manifestano inizialmente con una fase di crescita radiale con pigmentazione maculare. Le lesioni della congiuntiva sono visibili e questo ne facilita la diagnosi. I melanomi mucosi sono più frequenti nelle donne, specialmente quelli del tratto genitale. I melanomi di vulva e vagina rappresentano il 50% dei melanomi mucosi nelle donne. In entrambi i sessi altrimenti la cavità nasale rappresenta la localizzazione più frequente. A differenza del melanoma cutaneo, non vi è apparente associazione con le radiazioni UV. A livello molecolare differiscono dai melanomi cutanei. La mutazione driver più frequente è quella a carico di RAS che porta ad un'attivazione della via della MAP chinasi. Meno del 10% presenta mutazioni di BRAF

(24) (25) (26). Solo a livello vulvovaginale BRAF è mutato nel 26% e RAS in misura minore (27). C-KIT mutato nel 5-20%, più spesso a livello vulvovaginale e anorettale (28) (27) (24) (25).

1.8.7 Melanoma nevoide

È un gruppo eterogeneo di rare lesioni che istologicamente somigliano a nevi benigni per la loro simmetria e apparente maturazione nella loro discesa nel derma, ponendo grande rischio di diagnosi errata. Gli elementi che ci permettono una corretta diagnosi istologica includono ipercromasia marcata del nucleo delle cellule tumorali, la presenza di mitosi, la crescita espansiva delle cellule dermiche. Clinicamente questo corrisponde ad una papula o un nodulo marrone chiaro, più spesso con diametro maggiore di 1cm in un giovane adulto (29).

1.8.8 Melanoma Spitzoide

È un sottotipo di melanoma che clinicamente e istologicamente somiglia a un nevo di Spitz ma tende ad essere più grande, asimmetrico e con colorazione irregolare. Le caratteristiche che favoriscono la diagnosi rispetto al nevo di Spitz sono le grandi dimensioni (maggiore di 1cm nel diametro maggiore), una spessa componente invasiva (spessore di Breslow maggiore di 2mm), l'alto numero di mitosi, la presenza di molte cellule con citologia atipica e lesioni con decorso clinico preoccupante come crescita rapida delle dimensioni o satellitosi. La distinzione clinica ed istologica tra le due lesioni è spesso difficile e quando presentano caratteristiche sovrapposte sia al nevo di Spitz che al melanoma sono classificate come tumore di Spitz atipico con comportamento biologico incerto (AST) (30). L'analisi genetica della lesione può aiutare a differenziare un nevo benigno dal melanoma (31).

1.8.9 Melanoma Uveale

Il melanoma uveale è la più comune lesione maligna intraoculare, rappresenta il 5% di tutti i melanomi e si sviluppa prevalentemente a livello della coroide, seguito da corpo ciliare e dall'iride dell'occhio (32). C'è un'incidenza 8 volte maggiore nei soggetti caucasici rispetto ai soggetti di razza nera e l'età media alla diagnosi è di 58 anni. I fattori di rischio includono la presenza di nevi coroidali, un nevo di Ota e la sindrome del nevo displastico. Clinicamente i pazienti si presentano o con perdita, distorsione della visione, senza dolore, oppure il tumore è diagnosticato in pazienti asintomatici durante un controllo oftalmologico di routine. Il rischio di metastasi potrebbe essere connesso con le aberrazioni cromosomiche. Pazienti con monosomia 3 (circa il 50% dei pazienti) ha un outcome molto peggiore, con una mortalità del 75.1% mentre per quelli con disomia 3 presentano una mortalità del 13.2% a 5 anni (33). I pazienti in genere muoiono per metastasi epatiche (34).

1.9 Trattamento chirurgico del melanoma primario

La terapia standard per il melanoma cutaneo primario è un'ampia escissione locale. Dopo la biopsia escissionale con margine sano di 2 mm è quindi necessario procedere ad un allargamento chirurgico. Lo scopo dell'ampia escissione è quello di prevenire le recidive locali dovute alla persistenza subclinica della malattia (80) (81). Il rischio di metastasi satelliti è direttamente correlato con lo spessore della lesione e perciò la dimensione dei margini dipende dallo spessore della lesione (82) (80). Per un melanoma in situ il margine di allargamento raccomandato è di 0.5cm, per melanomi con Breslow fino a 2mm il margine è di 1cm, con Breslow maggiore di 2mm si applica un margine di 2cm. Escissioni maggiori con margini fino a 5cm non hanno dimostrato

diminuire il tasso di recidiva (83). Ogni paziente dovrebbe essere valutato individualmente, prendendo in considerazione la localizzazione della lesione e la presenza di fattori di rischio. Le escissioni a livello di dita, pianta dei piedi, orecchie, volto, vagina o ano presentano differenti considerazioni in quanto queste sono aree molto sensibili dal punto di vista estetico/funzionale e quindi potrebbe essere presa in considerazione l'utilizzo di margini ristretti stipetto a quelli utilizzati in altre sedi (84). I margini devono essere istopatologicamente liberi.

1.10 Trattamento chirurgico metastasi locoregionali

1.10.1 Malattia linfonodale microscopica

Nei melanomi con spessore minore di 1mm i secondarismi a livello linfonodale sono rari, in quelli con spessore compreso tra 1,5mm e 4mm si hanno nel 25% dei casi e in melanomi con spessore maggiore di 4mm le metastasi linfonodali sono presenti nel 60% dei casi. La biopsia del linfonodo sentinella è un potente strumento per la stadiazione che identifica micro-metastasi linfonodali ed è indicata per tutti i pazienti con melanoma primitivo di spessore maggiore di 1 mm o nei melanomi pT1b (melanoma con spessore < 0,8 mm con ulcerazione o con spessore compreso tra 0,8-1 mm indipendentemente dalla presenza di ulcerazione) (85). Nei pazienti con melanomi pT1a (melanoma con spessore <0,8 mm senza ulcerazione) e regressione maggiore del 75% può essere consigliata la biopsia del linfonodo sentinella. L'individuazione del linfonodo da asportare avviene tramite linfo-scintigrafia dinamica preoperatoria. In caso di positività del linfonodo sentinella si effettua una valutazione clinico-strumentale per ricercare l'eventuale coinvolgimento di altri linfonodi non satelliti ed infine si decide, a livello multidisciplinare, se effettuare una linfoadenectomia distrettuale o meno.

1.10.2 Malattia linfonodale macroscopica

Lo standard attuale per la terapia del melanoma macroscopico nei linfonodi (stadio IIIB o IIIC) è la linfoadenectomia del bacino regionale coinvolto. La malattia linfonodale non controllata è causa di morbidità correlata al melanoma con impatto altamente negativo sulla qualità di vita. La linfoadenectomia nel il melanoma metastatico locoregionale è associata con sopravvivenza a lungo termine (85).

1.11 Trattamento adiuvante

La terapia adiuvante è un trattamento utilizzato in quei pazienti con malattia resecata chirurgicamente che presentano alto rischio di recidiva, come quelli con melanoma primario ad alto spessore o con malattia linfonodale.

1.11.1 Interferon-α

Gli interferoni sono citochine in genere rilasciati da varie cellule in risposta alla presenza di diversi patogeni come virus, batteri, parassiti e anche cellule tumorali. Tipicamente gli interferoni proteggono le cellule vicine dall'infezione virale ma hanno anche altre funzioni come l'attivazione delle cellule natural killer e dei macrofagi ed incrementano il riconoscimento immunitario tramite un aumento delle molecole MHC di classe I e II. In più, l'interferon-alfa ha attività antineoplastica diretta che porta all'inibizione della proliferazione cellulare tumorale probabilmente attraverso l'attivazione di STAT1 e presenta anche un possibile effetto anti-metastatico (87) (88) (89) (90).

Nel trattamento del melanoma però, l'interferon-alfa ha solo un'attività moderata e i vantaggi associati a questo trattamento non sono chiari.

1.11.2 Immunoterapia e Target therapy

Nei pazienti con malattia in stadio 3 è stato approvato il trattamento con l'anticorpo anti CTLA-4 ipilimumab. Il trattamento con ipilimumab in pazienti con malattia in III stadio ha portato un miglioramento della sopravvivenza media senza recidiva di 9 mesi ma non è ancora chiaro se ciò porta benefici sulla sopravvivenza globale del paziente (44). Gli effetti collaterali sono principalmente autoimmunitari e possono essere severi ma maneggevoli. Trattamenti con bloccanti dei checkpoint immunologici meno tossici come nivolumab o pembrolizumab diretti contro la proteina-1 della morte cellulare programmata sono stati riportati essere anche più efficaci e più tollerabili, riducendo della metà il rischio relativo di recidiva.

Oltre all'immunoterapia, anche la Target therapy con agenti anti BRAF può essere utilizzata come trattamento adiuvante.

1.11.3 Radioterapia adiuvante

La radioterapia adiuvante effettuata dopo una linfoadenectomia totale può aiutare a controllare le metastasi nel bacino linfonodale in pazienti con melanoma in terzo stadio. Le raccomandazioni si basano si analisi retrospettive focalizzate sulla probabilità di recidiva linfonodale in funzione di differenti fattori di rischio (91) (92) (93). Sono stati individuati 3 principali fattori di rischio per recidiva: la presenza di tre o più metastasi linfonodali, linfonodi con diffusione extracapsulare o

linfonodi con diametro maggiore di 3 cm. La radioterapia adiuvante dovrebbe essere presa in considerazione anche in caso di recidiva linfonodale. Nei pazienti sottoposti a radioterapia adiuvante si ah un controllo loco-regionale significativamente maggiore ma non si ha alcun cambiamento sulla sopravvivenza libera da malattia o sulla sopravvivenza globale (94).

1.12 Trattamento delle metastasi satellite o in-transit

In generale le metastasi satellite o in-transit dovrebbero essere escisse chirurgicamente ogni volta che ciò sia possibile con intento curativo, ma, se la presenza di lesioni multiple rendono la chirurgia un approccio irragionevole, dovrebbero essere prese in considerazione altre opzioni di trattamento. Nella malattia localmente limitata, la radioterapia potrebbe essere una buona opzione, specialmente con metastasi piccole multiple (95). L'applicazione aggiuntiva di ipertermia può incrementare il tasso di risposta completa (96). Metastasi piccole e superficiale rispondono molto bene alla interleuchina-2 intralesionale. Per metastasi più grandi iniezioni intralesionali con il virus oncolitico Talimogene Laherparepvec (T-VEC) o l'elettrochemioterapia (ECT) sono opzioni terapeutiche da prendere in considerazione. Se il trattamento locale non porta al controllo locale, i pazienti che presentano malattia diffusa alle estremità possono beneficiare di una chemioterapia applicata localmente con perfusione isolata degli arti. Tutte le opzioni di trattamento sistemico sono anche disponibili per la malattia non resecabile di III stadio.

1.12.1 Interleuchina-2 Intralesionale

È un approccio molto efficace specialmente per le metastasi piccole e superficiali, con un tasso di risposta maggiore dell'80% se applicato 2/3 volte a settimana per varie settimane. In un'analisi

retrospettiva sono stati notati tempi di sopravvivenza inaspettatamente lunghi e una buona risposta a chemioterapie successive, suggerendo che a questa somministrazione intralesionale si possa accompagnare un effetto sistemico (97). Il trattamento è ben tollerato con lievi effetti collaterali come dolore locale, gonfiore e leggeri sintomi influenzali.

1.12.2 Talimogene Laherparepvec (T-VEC)

L'applicazione intralesionale di virus oncolitici è una nuova opzione terapeutica per pazienti con malattia non resecabile in III stadio o Stadio IV M1a. T-VEC è un herpes virus (di tipo 1) transgenico che è selettivamente replicato in tumore e produce il fattore stimolante colonie di granulociti-macrofagi (GM-CSF) che aumenta la risposta immune localmente e potenzialmente anche a distanza (98). Questo trattamento è relativamente ben tollerato con astenia e febbre.

1.12.3 Elettrochemioterapia (ECT)

Rappresenta un'opzione terapeutica efficacie e tollerabile per pazienti con metastasi in-transit ma ha bisogno di speciali equipaggiamenti tecnici. ECT è una combinazione di una chemioterapia locale o sistemica (generalmente bleomicina o cisplatino) con impulsi elettrici applicati intralesionalmente. Questi portano ad una contrazione muscolare dolorosa, perciò la procedura deve essere svolta in anestesia generale o anestesia locale con sedazione ed è generalmente effettuata in sala operatoria. Teoricamente, gli impulsi elettrici aumentano la permeabilità delle membrane delle cellule tumorali (elettroporazione) e le rende perciò sensibili al chemioterapico. Nonostante l'iniezione intralesionale si sia rilevata associata ad un maggior tasso di risposta in confronto con la chemio sistemica, per ragioni pratiche la chemio sistemica è preferita nella pratica clinica di routine (99).

1.12.4 Perfusione isolata degli arti (ILP)

La perfusione isolata degli arti può essere presa in considerazione per il controllo della malattia loco regionale limitata ad un arto. È una forma di chemioterapia regionale che porta maggiori dosi di agenti chemioterapici nell'arto affetto con minore tossicità sistemica. La tecnica consiste nel perfondere una estremità isolata in condizioni di ipertermia con agenti citotossici, in genere melfalan. ILP con melfalan è una forma efficace di terapia regionale con una risposta regionale parziale o completa fino all'80% dei casi (100). Il vantaggio è mirato al controllo loco regionale e non alla sopravvivenza globale. ILP può essere associato a serie morbosità locali, incluso un significativo danno tissutale o una sindrome compartimentale. I criteri di esclusione sono l'età avanzata e la presenza di comorbidità mediche serie. L'infusione isolata degli arti (ILI) è una tecnica più semplice e meno invasiva. Alcuni studi dimostrano che ILI con melfalan o actinomicina D hanno efficacia comparabile a quella di ILP con melfalan (101). ILI può essere presa in considerazione in quei pazienti che non possono essere sottoposti a ILP.

1.13 Trattamento della malattia metastatica non operabile

Fino a pochi anni fa il trattamento del melanoma al IV stadio era solo palliativo con l'intento di aumentare potenzialmente la sopravvivenza e la palliazione dei sintomi. Recentemente è stato raggiunto un progresso significativo e sono disponibili modalità di trattamento che migliorano sostanzialmente la sopravvivenza dei pazienti, con la possibilità di ottenere un controllo a lungo termine del tumore (57) (58) (102).

1.13.1 Chirurgia e radioterapia

Anche se la diffusione ematica dovrebbe portare la malattia ad essere classificata come non resecabile, l'escissione chirurgica di metastasi viscerali isolate (metastasectomia) può essere presa in considerazione portando, in alcuni pazienti, a lunghi intervalli liberi da malattia. Inoltre, la chirurgia può avere intento palliativo, per esempio per trattare metastasi cerebrali isolate o alleviare l'ostruzione dovuta a metastasi gastrointestinali. L'escissione chirurgica di cute/sottocute o di metastasi linfonodali distali può portare ad un miglior controllo loco-regionale ed a una minor morbidità (103). La radioterapia rappresenta un'opzione utilizzata preferibilmente per trattare metastasi cerebrali attraverso o radioterapia panencefalica (in paziente con più di 4 lesioni encefaliche) o con radioterapia stereotassica (se il paziente presenta meno di 4 lesioni encefaliche). La radioterapia palliativa può essere indicata anche per metastasi ossee dolorose o che portano a compressione del midollo spinale.

1.13.2 Immunoterapie

I tumori possono essere controllati dal sistema immunitario. Questo è dovuto al rilascio di antigeni da parte delle cellule tumorali morte e alla presentazione di questi antigeni da parte delle cellule dendritiche. Queste innescano e attivano le cellule T nei linfonodi che poi raggiungono ed infiltrano il tumore tramite la circolazione sanguigna. Infine, il riconoscimento delle cellule tumorali da parte di queste cellule T porta all'uccisione delle cellule tumorali e alla eliminazione del cancro (104). Un fenomeno già visto nei melanomi primari è la regressione, ma questa può essere presente anche a livello delle metastasi ed è generalmente associata ad un outcome favorevole (105). Si pensa che l'efficienza della risposta immune e la presenza di linfociti infiltranti il tumore siano correlati con la sopravvivenza del paziente (106) (51). In più è noto che i pazienti immunodepressi, per esempio i pazienti trapiantati, presentano un rischio maggiore di sviluppare il

melanoma e mostrano un decorso clinico più aggressivo della malattia (107). Quindi trattamenti che stimolano la risposta immune hanno la potenzialità di combattere efficacemente il cancro. Il punto di svolta per l'immunoterapia nel trattamento del cancro si è avuto con la scoperta che la risposta immune delle cellule T è controllata da interruttori on e off, i cosiddetti checkpoint immunologici, che proteggono il corpo da risposte immuni possibilmente dannose.

1.13.2.1 Blocco dei checkpoint immunologici

L'attivazione delle cellule T è dovuta a 2 segnali stimolatori trasmessi attraverso diversi recettori di superficie: uno è il T-cell receptor (TCR) che riconosce gli antigeni associati alle molecole presentanti l'antigene (MHC), il secondo è il legame con una molecola costimolatoria come CD28, CD27, GITR, OX40 o ICOS. All'attivazione, le cellule T esprimono recettori inibitori come CTLA-4, PD-1, TIM-3, e LAG-3, i cosiddetti checkpoint immunologici, che portano a inibizione della risposta delle cellule T e anergia. L'ipilimumab è un anticorpo monoclonale IgG1 umanizzato che lega CTLA-4 e blocca l'inibizione della risposta delle cellule T. L'ipilimumab è stato il primo farmaco a dimostrare un miglioramento significativo nella sopravvivenza globale in pazienti con melanoma in IV stadio nonostante un tasso di risposta di solo il 10% (102) (108). Questi risultati sono stati migliorati con l'utilizzo di anticorpi bloccanti contro PD-1 nivolumab e pembrolizumab. PD-1 sulla superficie delle cellule T attivate lega PD-L1 e PD-L2 che sono espresse nei tessuti periferici e in differenti tipi di cancro, incluso il melanoma. Il pathway PD-1/PD-L1 gioca un ruolo critico nel meccanismo di fuga del tumore dal sistema immunitario in quanto il suo legame porta una diminuzione delle cellule T infiltranti il tumore. Il blocco di PD-1 nel melanoma porta ad una riduzione significativa del tumore nel 30-40% dei pazienti e prolunga la sopravvivenza libera da malattia e la sopravvivenza globale (58) (109). I pazienti con espressione tumorale di PD-L di almeno il 5% potrebbero avere una migliore risposta al trattamento che va dal 46% per pazienti PD-

L1 positivi al 27% in pazienti PD-L1 negativi (110). La sopravvivenza a 2 anni varia dal 57.2% nei pazienti PD-L1 positivi al 32.6% nei pazienti PD-L1 negativi (111). Quindi pazienti PD-L1 negativi rispondono comunque al trattamento. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che l'espressione di PD-L1 è focale e dinamica ed errori di campionamento nelle biopsie di piccole dimensioni potrebbero dare falsi negativi. Nei pazienti con melanoma non è necessario testare l'espressione di PD-L1 per somministrare anti-PD-1. La somministrazione combinata di ipilimumab e nivolumab porta ad una risposta notevole nel melanoma. I tassi di risposta arrivano 58%, con una sopravvivenza media libera da malattia di 11.5 mesi nei pazienti trattati con la terapia in combinazione rispetto ad un tasso di risposta del 19% e ad una sopravvivenza media libera da malattia di 2.9 mesi osservati con la monoterapia con ipilimumab (112). Inoltre, le risposte alla immunoterapia combinata sembrano essere più veloci. Il beneficio principale per i pazienti trattati con immunoterapia è la durata della risposta ottenuta. La percentuale di pazienti in cui il tumore regredisce dopo terapia con anti-CTLA-4 e anti-PD-1 è comparabile ai tassi di risposta dopo target therapy, però la durata delle risposte indotte dall'immunoterapia (più di 10 anni in alcuni casi trattati con bloccanti dei checkpoint e più di 20 anni in alcuni pazienti dopo il-2) appare essere superiore alla risposta dopo target therapy è suggerisce la guarigione di molti di questi pazienti. Sfortunatamente nel trattamento del melanoma oculare metastatizzato l'immunoterapia ha avuto un successo limitato, con nessuna risposta e sopravvivenza globale di 6.8 mesi (113). Gli effetti collaterali di questi trattamenti possono essere severi e pericolosi per la vita del paziente. Consistono principalmente in effetti autoimmuni, i cosiddetti eventi avversi immuno-correlati contro differenti organi secondari alla stimolazione immunitaria. I più frequenti effetti collaterali colpiscono la pelle, il fegato, il tratto gastrointestinale e il sistema endocrino (ipofisi, tiroide). La dermatite è tipicamente di grado blando (114). Eventi avversi immuno-correlati che colpiscono altri organi, come la colite, possono essere severi e richiedono un trattamento immunosoppressivo ad alte dosi per prevenire complicazioni come la perforazione intestinale. Anche se la caratteristica degli effetti collaterale è la stessa per gli anti CTLA-4 e anti PD-1 o per la combinazione dei due,

quello che cambia è la frequenza. Effetti avversi severi si evidenziano nel 16% dei pazienti trattati con nivolumab, nel 27% di quelli trattati con ipilimumab e nel 55% in quelli con terapia combinata. Inoltre, i pazienti trattati con terapia combinata tendono ad avere diversi organi colpiti. Gli effetti collaterali devono essere trattati tempestivamente, scegliendo il tipo di terapia immunosoppressiva in base alla severità dei sintomi. Il trattamento della tossicità farmaco indotta con agenti immunosoppressivi non sembra interferire con l'attività antitumorale. Ci potrebbe essere un legame tra numero e severità degli effetti collaterali e un migliorato outcome clinico (115) (116) (117). L'uso di anticorpi anti-checkpoint delle cellule T per il trattamento del melanoma metastatico è diventata pratica comune ma c'è controversia su quali pazienti hanno bisogno di terapia combinata, se i biomarker possono essere utilizzati per selezionare quei pazienti che possono beneficiare di monoterapia anti-PD-1 e sulla miglior sequenza di target therapy e immunoterapia in pazienti con mutazioni BRAF.

1.13.2.2 Interleuchina 2 ad alte dosi

Il trattamento con interleuchina 2 (o aldesleukin) ad alta dose, che richiede ospedalizzazione in terapia intensiva, è somministrata in bolo endovena attraverso cicli di 1 settimana in centri con esperienza nella gestione di tossicità derivata da IL-2. Il trattamento è continuato fino a ottenere il massimo beneficio, generalmente 4-6 cicli distribuiti su 4-6 mesi per permetter il recupero dalla tossicità tra i cicli. La sopravvivenza libera da malattia a lungo termine è osservata nel 5% dei pazienti trattati (118). È associato a tossicità significativa con un notevole aumento della permeabilità capillare che pone il paziente a rischio di edema polmonare, insufficienza renale, ipotensione e disfunzioni cardiache. Il trattamento con IL-2 non è autorizzato in Europa a causa dei gravi effetti collaterali associati ad una non elevata attività complessiva del farmaco.

1.13.3 Target therapy

Il melanoma è caratterizzato da alta instabilità genetica che porta ad un alto tasso di mutazioni ed eterogeneità molecolare attribuiti agli effetti mutageni delle radiazioni UV. Le mutazioni puntiformi di BRAF sono molto frequenti nel melanoma, in particolare la sostituzione di valina con acido glutammico al codone 600 (V600E) che attiva costantemente il pathway delle MAPK (119). Le mutazioni di BRAF e NRAS si trovano nei due terzi dei melanomi, altre mutazioni sono amplificazioni di AKT3 o perdita di PTEN, che portano all'attivazione del pathway della PI3K. Inoltre, questi pathways possono essere iperattivati dalla sovraespressione o mutazione di recettori per fattori di crescita come c-Kit, Met e EGF-R o mutazione inattivante di NF1 (120).

1.13.3.1 Inibitori di BRAF/MEK

La mutazione BRAF V600 è più comune nei melanomi insorti su cute fotoesposta ed è presente in circa la metà dei melanomi (121). Il primo inibitore di BRAF utilizzato è stato sorafenib che è un inibitore aspecifico di RAF da assumere oralmente che inibisce B-raf e C-Raf oltre ad altre chinasi. Sorafenib ha dimostrato una ridotta attività nei pazienti con malattia non resecabile di III stadio o IV stadio (120) (122). Il beneficio clinico è stato diverso con lo sviluppo di inibitori selettivi di BRAF come vemurafenib e dabrafenib. Circa la metà dei pazienti con melanoma che presenta mutazione di BRAF V600 risponde e quelli che lo fanno hanno un a risposta incredibilmente veloce (123) (124). Il trattamento allunga sia la sopravvivenza libera da malattia da 7 a 8 mesi che la sopravvivenza globale da 16 a 18mesi (57) (125). Poiché i pazienti tendo a rispondere velocemente, questi agenti possono portare beneficio specialmente a quei pazienti con alta carica tumorale e possono fornire sollievo dai sintomi del tumore. Sfortunatamente la maggior parte dei pazienti

sviluppa resistenza alla terapia (126). Attraverso l'analisi genetica delle metastasi resistenti alla terapia, sono stati rilevate diverse mutazioni genetiche che attivano la via delle MAPK bypassando BRAF. Queste includono mutazioni somatiche di NRAS, amplificazioni di BRAF e mutazioni in MAP2K1/K2, MITF e NF1. Ulteriori alterazioni con una relazione meno chiara con la resistenza sono state osservate nel pathway di PI3K incluso PIK3CA/R1, PTEN e HOXD8 o RAC1. La riattivazione di MAPK è il più frequente meccanismo di resistenza terapeutica acquisita, perciò gli inibitori di BRAF sono stati combinati con inibitori di MEK come trametinib e cobimetinib. La terapia di combinazione porta ad un tasso di risposta maggiore, fino al 70%, con una sopravvivenza libera da malattia media di 10-11 mesi e una sopravvivenza globale media di 2 anni. Quindi il trattamento combinato con inibitori di BRAF e MEK rappresenta lo standard di cura nei pazienti con melanoma con mutazioni BRAF in aggiunta alle opzioni immunoterapiche. I pazienti che sviluppano resistenza agli inibitori di BRAF e MEK sono candidati a immunoterapia o a trial clinici. Il trattamento è in genere ben tollerato con astenia, nausea, diarrea, artralgia ed effetti collaterali cutanei che includono esantemi, ipercheratosi, lesioni verrucose, neoplasie secondarie (carcinoma cutaneo a cellule squamose e anche melanoma) (57). Le lesioni squamose si spiegano con l'attivazione paradossa di MAPK durante il trattamento con BRAF inibitori nei cheratinociti con BRAF wild-type. Nella maggior parte delle lesioni si può trovare una mutazione di RAS (127) (128). Queste lesioni sono meno frequenti nella terapia combinata con BRAF e MEK inibitori. Alcuni effetti collaterali sono specifici per alcuni farmaci, come la fotosensibilità per vemurafenib e la febbre per dabrafenib. I MEK inibitori possono peggiorare una preesistente insufficienza cardiaca e portare a effetti collaterali oculari come occlusioni della vena retinica e retinopatie. Quindi i pazienti in terapia devono essere sottoposti a sorveglianza cardiologica e oftalmologica.

1.13.3.2 Inibitori di c-KIT

I melanomi che insorgono a livello acrale e mucoso sono geneticamente differenti dagli altri melanomi (63). La maggior parte di questi melanomi non presenta mutazioni di BRAF, ma un sottogruppo ha mutazioni attivanti o amplificazioni del recettore per la tirosinchinasi KIT. Studi recenti con inibitori delle tirosinchinasi (imatinib) hanno dimostrato una significativa risposta in pazienti con melanoma metastatico con mutazioni attivanti di c-KIT (129) (130). Il tasso di risposta nei pazienti che presentano melanoma con mutazione di c-KIT e trattati con imatinib è del 20-30% (131) (132).

1.13.4 Chemioterapia

L'agente alchilante dacarbazina è l'unico chemioterapico approvato per il melanoma metastatico e generalmente è molto ben tollerato. I tassi di risposta però sono solo il 10% circa con una durata di risposta media che va dai 4 ai 6 mesi (133). Gli effetti collaterali principali sono nausea e vomito che possono essere controllati con farmaci antiemetici. Temozolomide è un agente alchilante con gli stessi metaboliti attivi di dacarbazina ma può essere assunto per os e presenta la stessa efficacia (134). Le chemioterapie combinate come carboplatino con paclitaxel potrebbero avere migliori tassi di risposta ma non hanno benefici sulla sopravvivenza in confronto con la monoterapia e in genere presentano tossicità più elevata (120) (135). Con l'approvazione dei bloccanti dei checkpoint immunologici e degli inibitori di BRAF e MEK l'uso dei chemioterapici è svanito. Nessun regime chemioterapico ha mai dimostrato un miglioramento della sopravvivenza nei pazienti con melanoma metastatico. L'avanzamento della immunoterapia e della target therapy hanno relegato la chemioterapia alla palliazione dei sintomi.

1.14 Trattamento del melanoma primitivo delle mucose

Il trattamento chirurgico rappresenta la prima opzione terapeutica nella malattia locoregionale attraverso un'ampia escissione e una linfoadenectomia in caso di metastasi linfonodali locoregionali. Come terapia adiuvante postoperatoria può essere proposta la radioterapia, soprattutto a livello dei distretti di testa-collo e del tratto ano rettale, che porta ad un miglior controllo locale ma non influisce sulla sopravvivenza del paziente. Nella malattia metastatica si utilizzano immunoterapia con ipilimumab o con un anticorpo anti PD-1 oppure target therapy, scegliendo il farmaco in base alle mutazioni genetiche riscontrate nel campione bioptico.

1.15 Trattamento del melanoma uveale

Per il tumore di piccole dimensioni (con spessore di 1–2.5mm e larghezza della base di impianto minore di 5mm) in soggetti asintomatici ed anziani è possibile adottare una strategia di attesa e seguire il paziente in modo costante con esame OCT associato ad ultrasonografia ogni 3 mesi. Se la lesione tende a crescere rapidamente o si ha la comparsa di segni/sintomi è indicata la radioterapia.

Per il tumore di medie dimensioni (con spessore 2.5-10mm e larghezza alla base di impianto di 5-16mm) è indicata la brachiterapia con placche episclerali o la radioterapia con protoni accelerati (155) (156). Ciò permette di ottenere un aumento della sopravvivenza a 5 anni ma anche di conservare una discreta capacità visiva rispetto alla enucleazione.

Per il tumore di grandi dimensioni (con spessore maggiore di 10mm e larghezza della base di impianto maggiore di 16mm) si utilizza o l'enucleazione o la radioterapia con protoni.

Il melanoma uveale tende a metastatizzare per via ematogena prevalentemente a livello epatico, ma anche a livello polmonare, gastroenterico, osseo ovarico e renale. Rara è la metastatizzazione a livello linfonodale a causa dell'assenza di vasi linfatici nel globo oculare. Nel trattamento della malattia metastatica si utilizzano o chemioterapia con fotemustina o immunoterapia.

1.16 Trattamento delle recidive

In caso di recidiva locale su cicatrice si deve innanzitutto procedere con un esame citologico della lesione con ago sottile (FNAB) e ad una ristadiazione del paziente. Poi si procede con l'exeresi della lesione mantenendo un margine libero di 2cm. Il paziente così trattato può essere candidato a prendere parte a trial clinico o essere sottoposto a terapie adiuvanti (target therapy, immunoterapia) e dovrà essere effettuato un follow-up come se fosse un paziente in III stadio.

Se il paziente presenta recidive satellitari o in-transit, queste devono essere asportate ogniqualvolta sia possibile. In caso contrario si utilizzano terapie locoregionali (perfusione isolata degli arti, radioterapia, elettrochemioterapia) e/o sistemiche (trial clinici, immunoterapia, target therapy, chemioterapia).

Nei pazienti con recidive linfonodali si tende ad eseguire una exeresi chirurgica. Se la chirurgia non è un'opzione percorribile vengono anche utilizzate anche in questo caso terapie locoregionali (elettrochemioterapia, radioterapia) e/o sistemiche (trial clinici, target therapy, immunoterapia, chemioterapia).

1.17 Algoritmo terapeutico

- pTis e pT1a con N0 clinico → si esegue un amplia escissione chirurgica si inserisce il paziente in un programma di follow-up. Se la lesione presenta più del 75% di regressione, si effettua anche una biopsia del linfonodo sentinella.

- ≥ pT1b con N0 clinico → si esegue un amplia escissione chirurgica e si effettua la biopsia del linfonodo sentinella. In caso di linfonodo sentinella negativo si inserisce il paziente in un programma di follow-up oppure può essere discusso il suo inserimento in trial clinici o l'inizio di una terapia con IFNα (per stadio 2B o 2C e T ulcerato). Se si ha una positività alla biopsia del linfonodo sentinella, il paziente entra automaticamente in stadio III e il trattamento verrà scelto in base alla presenza o meno di metastasi clinicamente evidenti.

- Stadio III con N+ clinicamente evidente (operabile) → si esegue amplia escissione della lesione primaria e dissezione linfonodale completa. In caso di metastasi in transit, si esegue un'exeresi completa associata o meno a biopsia del linfonodo sentinella e a dissezione linfonodale completa. Il paziente può essere poi inserito in trial clinici o essere sottoposto a terapia con dabrafenib in associazione con trametinib (per i melanomi con mutazione BRAF) o a terapia con anti PD-1 (per i melanomi con BRAF mutato o wild-type). Infine, il paziente viene inserito in un programma di follow-up.

- Stadio III (inoperabile) e IV → nella malattia in IV stadio operabile si effettua un'exeresi chirurgica. Vengono trattate anche le metastasi in transit con elettrochemioterapia o perfusione isolata dell'arto o radioterapia o con terapia sistemica. Successivamente si valuta la presenza di mutazioni genetiche. In caso di BRAF wild-type la prima linea di trattamento consiste nell'inserire il paziente in trial clinici o nel somministrare anti PD-1. La seconda linea di trattamento consiste nell'utilizzo di ipilimumab o chemioterapia o KIT inibitore (se la lesione presenta mutazione di c-

KIT). In caso la lesione presenti una mutazione di BRAF la prima linea di trattamento è rappresentata dall'utilizzo combinato di inibitori di BRAF e MEK, oppure dall'utilizzo di anti PD-1 o nell'inserimento del paziente in trial clinici. La seconda linea di trattamento consiste di anti PD-1 o terapia combinata con inibitori di BRAF e MEK. Infine, linee successive includono ipilimumab o chemioterapia.

1.18 Follow-up

I pazienti con melanoma sono a rischio di recidiva locale, regionale e a distanza e il livello di rischio dipende dallo stadio iniziale alla diagnosi. Le visite di controllo rappresentano un'occasione per ricordare al paziente come eseguire un'autovalutazione mensile della pelle e dei linfonodi, per affrontare qualunque problematica di stress psico-emozionale e per educare il paziente alla prevenzione. Nei pazienti con altri fattori di rischio come una storia familiare positiva, la presenza di numerosi nevi o una difficoltà nell'autoesame cutaneo, potrebbero essere necessari dei follow-up più frequenti. Una consulenza genetica si rende necessaria in caso di forte storia familiare di melanoma o cancro pancreatico. La visita di controllo deve includere una completa esplorazione cutanea per cercare altre lesioni primarie, metastasi cutanee/subcutanee specialmente nella regione di distribuzione del tumore primario, la palpazione dei linfonodi accompagnata ad ecografia linfonodale e un'accurata anamnesi.

Melanoma in situ → si effettua un controllo annuale o semestrale in caso il paziente presenti numerosi nevi melanociti comuni o atipici.

Melanoma in stadio IA → si effettua un controllo clinico ogni 6-12 mesi per i primi 5 anni, successivamente si continua con una visita all'anno. In caso di necessità durante i primi 5 anni è

possibile sottoporre il paziente ad ecografia delle stazioni linfonodali e dell'area pericicatriziale relative alla lesione primitiva.

Melanoma in stadio IB-IIA → si effettua un controllo semestrale nei primi cinque anni e poi si continua con un controllo annuale. Nei primi cinque anni si effettua anche una ecografia addome annuale ed un esame ultrasonografico linfonodale e pericicatriziale semestrale.

Melanoma in stadio IIB → si effettua un controllo semestrale nei primi cinque anni e poi si continua con un controllo annuale. Durante i primi cinque anni il paziente viene sottoposto ad una TAC torace ogni anno e ad un esame ecografico di addome, area pericicatriziale e stazioni linfonodali relative alla lesione primitiva ogni sei mesi.

Melanoma in stadio IIC-III → si effettua un controllo ogni 3-4 mesi durante i primi due anni, poi semestralmente fino al quinto anno e successivamente la periodicità dei controlli è annuale. Il paziente viene sottoposto ad una TAC o PET/TAC ogni 6-12 mesi durante i primi tre anni, poi annualmente fino al quinto anno. Durante i primi cinque anni il paziente viene sottoposto durante ogni controllo clinico anche ad ecografia delle stazioni linfonodale e dell'area pericicatriziale relative alla lesione primitiva ed eventualmente anche a ecografia epatica (se il paziente esegue una PET/TAC).

Melanoma in stadio III inoperabile o IV → si effettua un controllo ogni 3 mesi nei primi 2 anni, poi ogni 6 mesi fino al quinto anno e successivamente si procede con controlli annuali. Il paziente viene inoltre sottoposto a TAC total body o PET/TAC ogni 3-6 mesi.

Melanoma uveale → si effettua un controllo oculistico con monitoraggio ecografico della lesione il mese successivo al trattamento e poi ogni sei mesi per i primi sei anni, successivamente il controllo è su base annuale. Durante i primi dieci anni si eseguono anche un'ecografia epatica semestrale ed

una TAC annuale. La frequenza della TAC è in caso di melanoma oculare in stadio IV è trimestrale nei primi due anni, poi semestrale fino al quinto anno ed infine annuale fino al decimo anno.

PARTE 2: STUDIO

2.1 Introduzione

Il melanoma primitivo della cavità orale (POM) è una malattia rara, rappresentando circa lo 0.5% delle neoplasie orali e lo 0.01% di tutte le biopsie orali che vengono effettuate (157) (158). Si ritiene che la sua incidenza sia rimasta stabile nel tempo, al contrario di quella del melanoma cutaneo che è cresciuta rapidamente negli ultimi decenni. Il POM è una neoplasia tipica dell'età adulta, quinta decade, raramente presente al di sotto dei 20 anni e predilige il sesso maschile (159). Interessa maggiormente il palato duro e l'alveolo mascellare (157) ed è più frequente in Giappone e in alcune regioni africane (es. Uganda) rispetto ai paesi occidentali (160) (161). In contrasto con i ben definiti fattori eziologici che contribuiscono allo sviluppo del melanoma cutaneo, l'ezio-patogenesi del POM è scarsamente compresa. È ben documentata la migrazione dei melanociti alla mucosa endodermica ed ectodermica, ma la funzione di questi melanociti nella mucosa non è ancora stata chiarita. D'altro canto, traumi meccanici, infezioni, fumo alcool e automedicazioni

sono stati suggeriti come possibili fattori causali (162). È un tumore estremamente aggressivo come il melanoma cutaneo ma, sfortunatamente, la maggior parte dei pazienti non presenta alcun sintomo precoce e per questo hanno mediamente uno spessore maggiore alla diagnosi rispetto al melanoma cutaneo. Inoltre, circa un terzo dei melanomi orali è amelanotico (163). Per questo la maggior parte dei melanomi della cavità orale sono diagnosticati ad uno stadio avanzato, con spessore di Breslow maggiore di 4 mm alla diagnosi (164), con una prognosi estremamente scarsa e un tasso di sopravvivenza a 5 anni tra il 15 e il 20% (157). Lo sviluppo di molti tumori sono mediate dalla proliferazione di nuovi vasi che permettono lo scambio di nutrienti, ossigeno e prodotti di scarto (165) (166). La valutazione della densità microvascolare (MVD), rilevata dall'anticorpo contro CD34, è usata frequentemente per quantificare l'angiogenesi ed è correlata con un outcome peggiore in diversi tumori come il cancro al seno (167), il carcinoma polmonare non a piccole cellule (168) e il melanoma (169).

CD34 è una glicoproteina transmembrana di 115-kDa che è espressa sulle cellule progenitrici ematopoietiche umane e sull'endotelio dei piccoli vasi di numerosi tessuti (170), tuttavia si sa poco sulla sua esatta funzione. Tutti i set di anticorpi monoclonali contro il CD34 reagiscono con l'endotelio delle arterie e delle venule ed è stato riscontrato che si colorano più intensamente con l'endotelio capillare (171). Per questi motivi il CD34 è stato precedentemente utilizzato per la rilevazione della proliferazione di piccoli vasi che rappresentano l'angiogenesi (172) (173).

Molti fattori angiogenici sono espressi in vivo dalle cellule del melanoma (174) (175) incluso il fattore di permeabilità vascolare o VEGF. Esso è ritenuto uno dei più potenti stimolatori dell'attivazione e della proliferazione endoteliale ed esercita numerose azioni biologiche importanti sulle cellule endoteliali (176) (177). Incrementa la permeabilità dell'endotelio alle macromolecole circolanti (176) e agisce anche come mitogeno selettivo delle cellule endoteliali (178) (179).

HIF-1 è un eterodimero composto da un'unità α e da un'unità ß: l'espressione di HIF-1 α è correlata con lo stato di ossigenazione cellulare, quella di HIF-1 ß è costitutivamente presente indipendentemente dall'ipossia cellulare (180). HIF-1α è considerato il principale fattore transattivo nel controllo del tasso di trascrizione del gene VEGF (181) (182).

La natura del pattern di crescita invasivo e della risposta angiogenica influenzano entrambe la capacità metastatica di un tumore.

Lo scopo del presente studio era quello di approfondire il ruolo dell'angiogenesi e dell'ipossia nel melanoma, studiando l'espressione immunoistochimica di VEGF, CD34 e HIF-1, esplorando le somiglianze e le differenze tra la localizzazione cutanea e mucosa del tumore poiché esistono prove di un comportamento più anomalo e imprevedibile del POM rispetto al melanoma cutaneo.

2.2 Materiali e metodi

2.2.1 Campioni di tessuto

I quarantasei melanomi primari maligni (sedici melanomi mucosi umani e trenta melanomi cutanei umani) inclusi in questo studio sono stati ottenuti dagli archivi della Sezione di Anatomia del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università Politecnica delle Marche.

Sono state valutate le caratteristiche cliniche dei pazienti, come sesso, età, sede e dimensione della neoplasia, e l'outcome finale degli stessi.

La diagnosi di melanoma primitivo della mucosa orale si è basata sull'esame istologico delle lesioni e sulle informazioni cliniche disponibili, che escludevano una storia di melanoma in un altro sito o un'evidenza di melanoma metastatico da un sito extramucoso. È stata riesaminata l'istopatologia di tutti i casi. Le diagnosi sono state effettuate su sezioni colorate con ematossilina ed eosina, ma in tutti i casi sono state eseguite anche la colorazione di Fontana-Masson e la colorazione immunoistochimica con anticorpi S-100, Melan A e HMB-45. Le diagnosi erano basate sui criteri usuali (184). Lo spessore del tumore è stato misurato da due ricercatori dell'anatomia patologica (CR, GG) con un micrometro oculare dallo strato più superficiale della mucosa o della cute, alla componente più profonda del melanoma invasivo (quando la superficie era intatta).

2.2.2 Immunoistochimica

Con un microtomo sono state ottenute sezioni istologiche dello spessore convenzionale di 6 µm dai blocchi selezionati (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA). Le sezioni sono state quindi deparaffinate e reidratate in un gradiente di etanolo e xilene. Il recupero antigenico (TUF solution, Histo-line Laboratories, Milano, Italy) è stato eseguito a 90 ° C per 10 minuti prima dell'incubazione con i seguenti anticorpi: anti-CD34 murino (clone My10) (diluizione 1:20, BD Biosciences, San Jose, CA), anti-VEGF-165 murino (clone C-1) (diluizione 1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), e anti-HIF-1α da coniglio (diluizione 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Gli anticorpi anti-VEGF-165 e anti HIF-1α erano collegati a una reazione catalizzata dalla fosfatasi alcalina anti-fosfatasi alcalina (APAAP) (Kit Dakocytomation, Milano, Italy). Per la visualizzazione dell'anticorpo, le sezioni sono state incubate con un substrato rosso veloce (Dakocytomation, Milano, Italy), che produce un prodotto finale rosso nel sito dell'antigene bersaglio. Per l'anticorpo anti-CD-34 è stata utilizzata la tecnica streptavidina-biotina-perossidasi (Envision plus kit, DakoCytomation, Milano, Italy) con 3.3 diaminobenzidina (0.05

diaminobenzidina in 1 M di tampone Tris, pH 7.6 e 0.01% di perossido di idrogeno) (Sigma-Aldrich, Milano, Italy) come cromogeno. Le sezioni sono state infine controcolorate con ematossilina di Mayer. Ogni serie includeva sezioni di controllo negativo appropriate che omettevano l'anticorpo primario. I controlli positivi per la reazione erano rappresentati da sezioni incluse in paraffina di carcinomi mammari.

Tutti i conteggi sono stati eseguiti simultaneamente da due ricercatori all'oscuro sull'esito del paziente (CR e G.L.), utilizzando un microscopio ottico a doppia osservazione. Entrambi dovevano concordare sul conteggio della positività a CD34, VEGF e HIF-1α. Le immagini sono state acquisite con una fotocamera digitale Nikon DS-Vi1 (Nikon Instruments, Europe BV, Kingston, Surrey, England).

La densità dei microvasi (MVD) è stata definita contando il numero di piccoli vasi positivi al CD34 nell'area con la più alta densità microvascolare ("hotspots" vascolari) nel campo microscopico di a 400 x (0,16 mm2 per campo) ed è stata calcolata la media dei microvasi in cinque campi. Abbiamo considerato come singolo microvaso numerabile qualsiasi cellula o cluster colorato che era chiaramente separato dai microvasi adiacenti. MVD è stato espresso come conteggio medio dei vasi positivi a CD34 per mm^2. La reattività delle cellule endoteliali e dei melanociti per VEGF e HIF-1α è stata contata utilizzando il software di imaging NIS Elements BR 3.22 (Nikon Instruments, Europe BV, Kingston, Surrey, England) (campo: 0.07 mm2, ingrandimento: x400) in almeno 10 campi/campione e quantificato come percentuale del totale delle celle contate. I campi sono stati selezionati in modo casuale valutando le aree più positive, moderatamente e meno positive.

MVD, melanociti e vasi positivi per VEGF e HIF-1α sono stati contati nel fronte invasivo e all'interno del tumore e le differenze sono state confrontate. Il centro tumorale e il fronte invasivo

del tumore sono stati valutati separatamente per ciascuna sezione. Il fronte invasivo del tumore era costituito da una banda di tumore larga 0,100 mm immediatamente adiacente al bordo invasivo.

2.2.3 Analisi statistica

I dati sono stati riassunti per media e intervallo per variabili continue. Le differenze tra i valori medi in diverse categorie sono state analizzate mediante test t di Student non appaiato e test di Kruskal-Wallis non parametrico. Tutta l'analisi statistica è stata eseguita dal pacchetto statistico SPSS (SPPS Inc. Chicago, IL).

2.4 Risultati

2.4.1 Informazioni cliniche

Nel melanoma orale abbiamo trovato una prevalenza nel sesso maschile rispetto a quello femminile di 2:1, e un intervallo di età tra i 42 e 89 anni, con un'età media di 65.5 anni. Il sito orale più frequente era il palato (n= 12, 75%) seguito dalla mucosa labiale (n=3, 18.7%), solo un caso è stato diagnosticato sulla mucosa buccale/vestibolare. Dei melanomi orali presi in considerazione, 14 erano melanomi invasivi (n=14, 87.5%), e 2 in situ (n=2, 12.5%). Lo spessore tumorale variava dai 2.00 mm ai 10.00 mm (media: 4.7±1.8). 14 POM mostravano un pattern di crescita epitelioide, solo 2 casi mostravano un pattern di crescita a cellule fusate. La dimensione media del tumore era di 0.7 cm (range da 0.5 a 1.5 cm).

Per quanto riguarda il melanoma cutaneo la distribuzione tra i generi era 1:1, e l'intervallo di età andava dai 30 a 82 anni, con un'età media di 54.8 anni. Il sito cutaneo più frequente era il dorso (n= 12, 40%) seguito dalle gambe (n=8, 26.6%). Lo spessore tumorale andava dai 1.80 mm ai 10.00 mm (media: 4.1±1.5). Sei casi presentavano spessore di Clark III, 14 casi spessore di Clark IV e 10 casi spessore di Clark V. Tredici melanomi cutanei mostravano un pattern di crescita epitelioide e 17 casi esibivano un pattern di crescita a cellule fusate. La dimensione media del tumore era di 0.6 cm (range da 0.5 a 1.8 cm).

Dei 14 campioni di POM, 2 appartenevano a pazienti ancora in vita con malattia e 3 a pazienti ancora in vita senza evidenza di malattia, risultando in un tasso di sopravvivenza a 5 anni del 35.7%. In 23 su 30 melanomi cutanei con follow-up ≥ di 5 anni la sopravvivenza globale era del 49%.

2.4.2 Valutazione immunoistochimica

L'esame immunoistochimico ha mostrato che nel POM i vasi positivi a CD34 erano per lo più concentrati nel fronte invasivo del tumore e meno all'interno del tumore. La MVD media era di 63.72 ±15.17 per i vasi del fronte invasivo e 42.27 ± 18.03 per i vasi intratumorali e questa differenza era statisticamente significativa (p=0.0009).

I vasi del fronte invasivo mostravano un aumento statisticamente significativo dell'espressione di VEGF (40.83 ± 15.05) e di HIF-1α (24.75 ± 18.46) rispetto ai vasi intratumorali (VEGF 28.33 ± 6.15, p=0.014; HIF-1α 11.20 ± 9.64, p=0.043). Nei nidi tumorali abbiamo osservato un'espressione simile di VEGF e HIF-1α sui melanociti sia nel fronte invasivo (VEGF 35.0 ±12.25; HIF-1α 20.52 ±12.97) che all'interno della lesione (VEGF 37.0 ±10.06; HIF-1α 24.01 ±13.06).

Tab.1 Localizzazione immunoistochimica di CD34, VEGF e HIF-1α nel melanoma orale primario.

CD34		**VEGF**				**HIF-1α**			
Vasi Intratumor	**Vasi fronte inv**	**Melanociti intratumor (%)**	**Melanociti fronte inv (%)**	**Vasi intratumor (%)**	**Vasi fronte inv (%)**	**Melanociti intratumor (%)**	**Melanociti fronte inv (%)**	**Vasi intratumor (%)**	**Vasi fronte inv (%)**
42.27±18.03	63.72±15.17	33.75±10.25	35.25±9.57	28.33±6.15	40.83±15.05	18.42±11.35	24.33±12.86	11.20±9.64	24.75±18.46
P=0.0009		P= 0.715		**P=0.014**		P=0.245		**P=0.043**	

Intratumour: Intratumorale; Inv: Invasivo
MVD è stato espresso come conteggio medio dei vasi positivi a CD34 per mm2.
%: I valori rappresentano la percentuale media di cellule colorate rispetto al totale delle cellule contate.
Le differenze sono state analizzate mediante test di Student t non accoppiati e test di Kruskal-Wallis non parametrico.

Figura 1

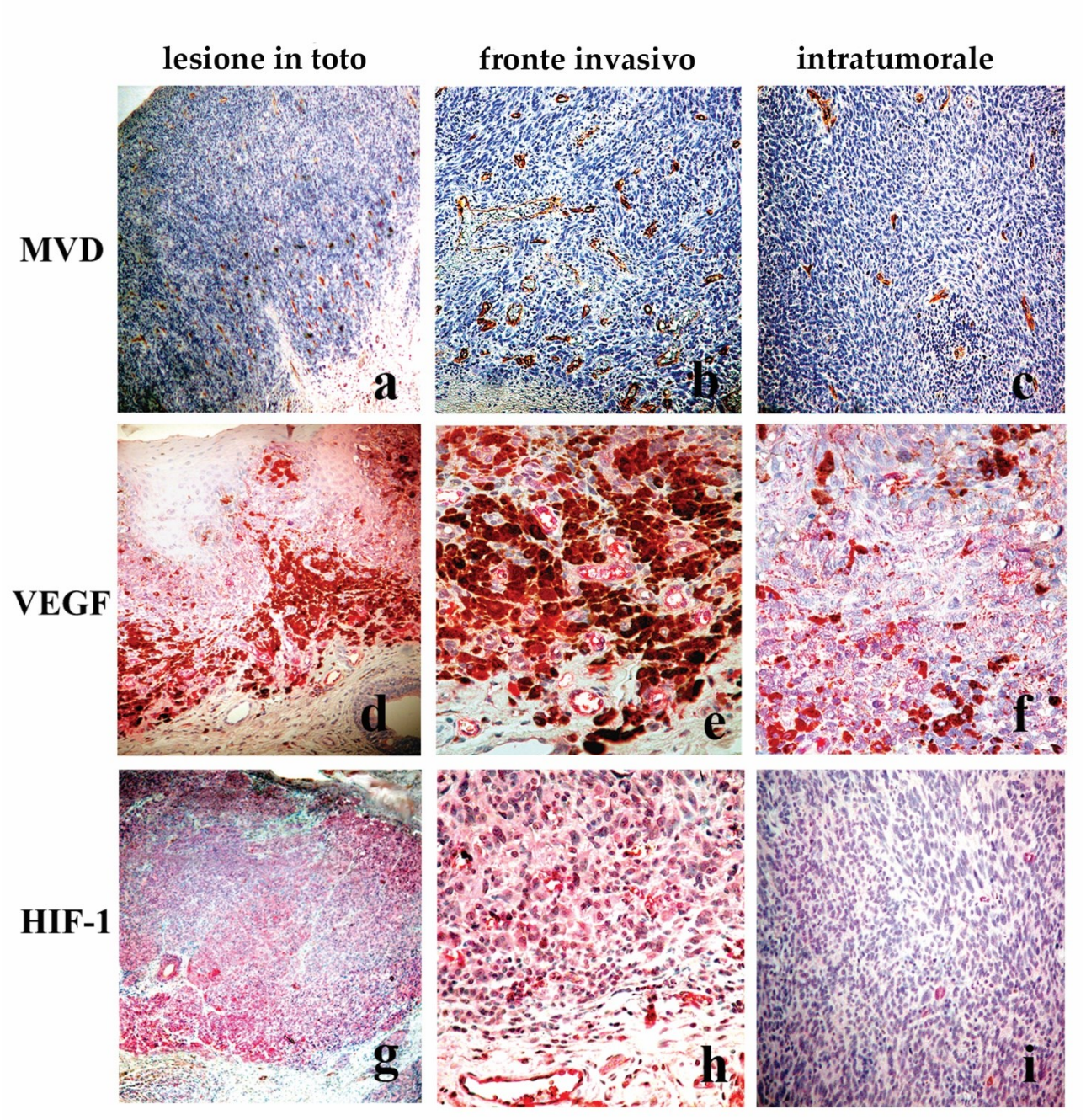


Fig.1 Espressione immunoistochimica di CD34 (MVD), VEGF e HIF-1α nei POM. I vasi sono contrassegnati dalla lettera V e i melanociti dalla lettera M. I vasi CD34 positivi sono concentrati principalmente nel fronte invasivo del tumore (a) e meno all'interno della lesione (b) (ingrandimento originale 200 x), (reazione immunoperossidasi); c) Localizzazione di VEGF: i vasi del fronte invasivo mostrano una significativa espressione di VEGF rispetto ai vasi intratumorali (d) mentre i nidi tumorali mostrano un'espressione simile sia nel fronte invasivo (c) che all'interno della lesione (d) (300x); e) Localizzazione di HIF-1α: analogamente al VEGF, i vasi del fronte invasive mostrano un'espressione più forte rispetto ai vasi intratumorali (f), i nidi tumorali mostrano un'espressione simile sia nel margine invasivo (e) (250x) che all'interno della lesione (f) (200x), (reazione fosfatasi alcalina anti-fosfatasi alcalina).

Contrariamente al POM, il melanoma cutaneo non mostrava alcuna differenza significativa nell'espressione di CD34, VEGF e HIF-1α nei vasi differentemente localizzati. Inoltre, abbiamo osservato un'espressione di VEGF e HIF-1α simile nei melanociti neoplastici del fronte tumorale o intralesionali.

Tab.2 Localizzazione immunoistochimica di CD34, VEGF e HIF-1α nel melanoma cutaneo primario.

CD34		**VEGF**				**HIF-1α**			
Vasi intratumor	**Vasi fronte inv**	**Melanociti intratumor (%)**	**Melanociti fronte inv (%)**	**Vasi intratumor (%)**	**Vasi fronte inv (%)**	**Melanociti intratumor (%)**	**Melanociti fronte inv (%)**	**Vasi intratumor (%)**	**Vasi fronte inv (%)**
67.44±13.48	70.10±12.88	37.0±10.06	35.0±12.25	32.60±20.49	28.16±14.77	24.01±13.06	20.52±12.97	2.35±2.86	1.47±1.63
P=0.657		P= 0.695		P=0.585		P=0.556		P=0.402	

Intratumour: Intratumorale; Inv: Invasivo
MVD è stato espresso come conteggio medio dei vasi positivi a CD34 per mm2.
%: I valori rappresentano la percentuale media di cellule colorate rispetto al totale delle cellule contate.
I valori sono medie ± deviazione standard (M ± SD).
Le differenze sono state analizzate mediante test di Student t non accoppiati e test di Kruskal-Wallis non parametrico.

Figura 2

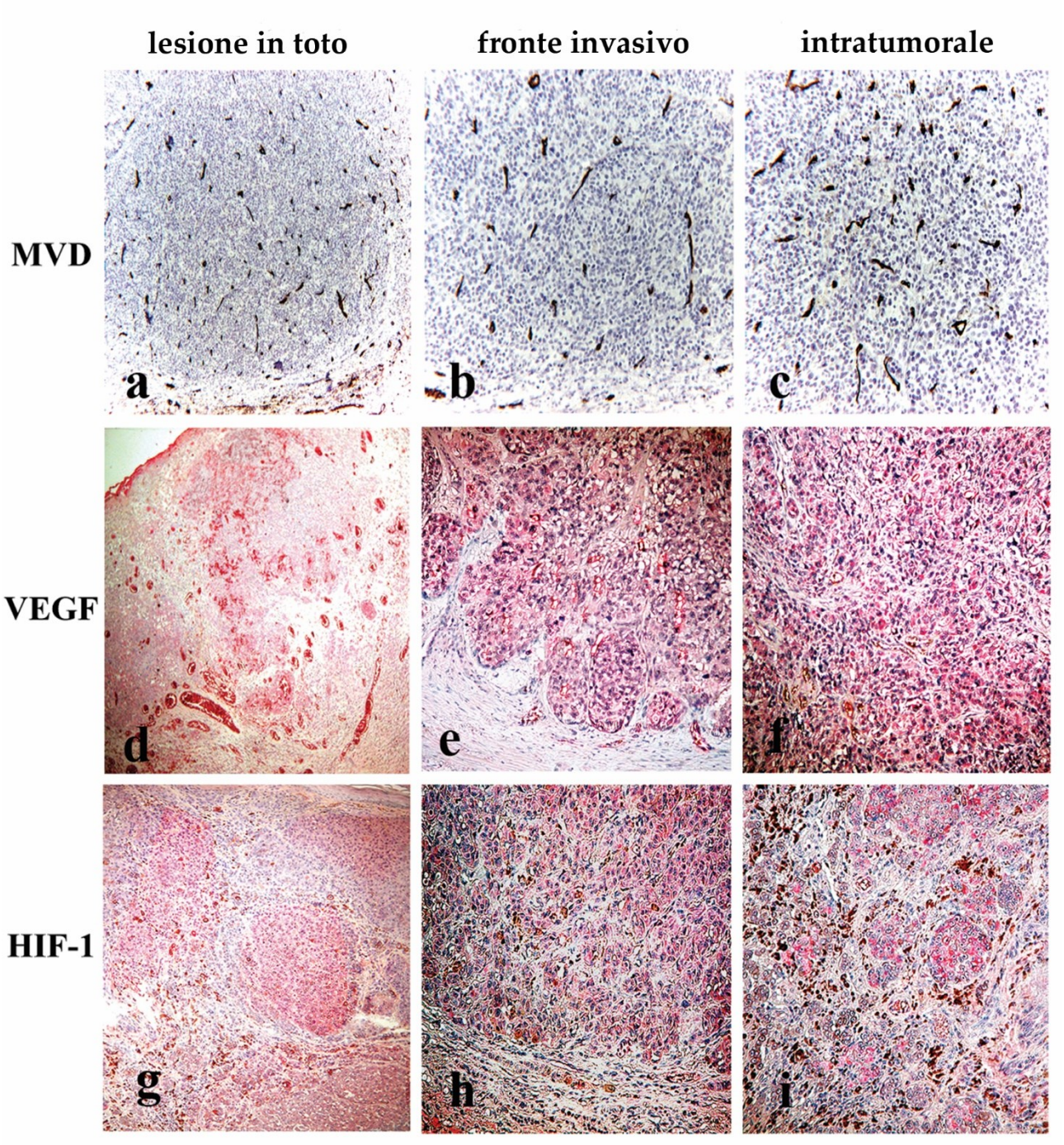


Fig.2 Espressione immunoistochimica di CD34 (MVD), VEGF e HIF-1α nei melanomi cutanei. I vasi sono contrassegnati dalla lettera V e i melanociti dalla lettera M. a) i vasi CD34 positivi sono ugualmente concentrati sia nel fronte invasivo (a) che all'interno della lesione (b) (ingrandimento originale 200 x), (reazione immunoperossidasi); Localizzazione di VEGF: i vasi e i melanociti neoplastici mostrano espressione simile sia nel fronte invasivo (c) che all'interno del tumore (d) (200x); L'espressione di HIF-1α è simile sia nel fronte invasivo (e) che all'interno del tumore (f) (200x), (reazione fosfatasi alcalina anti-fosfatasi alcalina).

2.3 Discussione

L'angiogenesi è un processo essenziale nella progressione del tumore maligno ed è correlata alla sua aggressività. Il POM differisce dalla sua controparte cutanea per un diverso comportamento biologico e in particolare per la sua scarsa prognosi, giustificando la necessità di indagare maggiormente i meccanismi che contribuiscono all' invasività delle cellule melanomatose. A questo riguardo uno dei risultati più importanti di questo studio è la differente espressione regionale di tutti i marker angiogenici e di ipossia nel POM con un aumento dell'espressione nel margine invasivo rispetto al compartimento intratumorale. Infatti, abbiamo riscontrato una ipovascolarità all'interno del POM, mentre nei margini invasivi, dove le cellule tumorali continuavano ad invadere il tessuto dermico, era presente una robusta risposta angiogenica. Al contrario, l'analisi della densità vascolare nel melanoma cutaneo non ha mostrato alcuna differenza tra il centro e i margini invasivi del tumore. Questi risultati sembrano non supportare precedenti studi (185) in cui è stato suggerito che i cambiamenti nella vascolarizzazione dipendano dalla natura del tumore in questione. Noi pensiamo che tale differenza possa anche dipendere dalla localizzazione, come osservato in un altro studio sul cancro colorettale (186). Il tumore potrebbe emergere dal suo stato dormiente inducendo la crescita di nuovi vasi sanguigni e questa sorta di angiogenesi sembrerebbe essere direttamente proporzionale alla malignità del tumore (187). È stato suggerito che molti tumori cooptino rapidamente i vasi dell'ospite preesistenti per creare una massa tumorale iniziale ben vascolarizzata, mentre i vasi localizzati centralmente sono di nuova formazione per angiogenesi indotta dal tumore (185) (188). Inoltre, le cellule di melanoma hanno dimostrato di essere in grado di adoperare una sorta di "vasculogenic mimicry" essendo in grado di generare strutture capillaro-simili senza il coinvolgimento di cellule endoteliali pre-esistenti (189) (190). Tali strutture vascolari, pur non avendo prettamente l'architettura dei normali vasi sanguigni, sono comunque in grado di trasportare il plasma e i globuli rossi. Il meccanismo di "vasculogenic mimicry" identificato in diversi tumori e in particolare nei melanomi uveali, cutanei e delle mucose (191) determina quindi la produzione di

strutture simil-capillari che possono essere confuse con i normali vasi sanguigni. Infatti, non sono stati ancora individuati dei marcatori ultrastrutturali e immunoistochimici che discriminino accuratamente le cellule endoteliali e tali canali vascolari(192). È noto che la generazione di canali vascolari altamente modellati e funzionali da parte del tumore stesso rappresenti un marker di fenotipo tumorale aggressivo (189) e, in merito a ciò, Folkman (193) ha suggerito che la presenza di cellule tumorali nel rivestimento dei vasi potrebbe essere strettamente connessa con lo sviluppo di metastasi. È stato dimostrato da Foss et al. (194) che proprio nel melanoma uveale un'elevata densità microvascolare all'interno del tumore è associata a una ridotta sopravvivenza. In ogni caso sembrerebbe che solo cellule tumorali altamente invasive siano in grado di generare il meccanismo della "vasculogenic mimicry", e questo fornirebbe una spiegazione del perché esso si ritrova in neoplasie con decorso clinico aggressivo (195). Tuttavia, l'entità e il significato fisiopatologico di questo fenomeno non sono ancora chiari e i risultati non sono considerati convincenti da altri autori (196).

Il processo di formazione dei vasi si basa su una complessa interazione di varie vie di trasduzione del segnale. Tra queste, un interesse speciale è stato dedicato al VEGF. Studi di knockout genico nei topi hanno dimostrato che VEGF e i suoi recettori, Flk1 / KDR, sono assolutamente necessari per le prime fasi dello sviluppo vascolare nell'embrione. I topi privi di VEGF mostrano anomalie nella differenziazione delle cellule endoteliali, nella proliferazione e formazione dei vasi (197) (198) (199). Il VEGF agisce in modo piuttosto specifico sull'endotelio vascolare perché i recettori del VEGF sono in gran parte limitati a queste cellule; Il VEGF agisce per avviare la proliferazione e la germinazione dei processi e può promuovere la formazione di nuove strutture simili a vasi. Inoltre, il VEGF sembra svolgere anche un ruolo nel promuovere la sopravvivenza di vasi nuovi fragili che non sono stati stabilizzati da interazioni mature con la matrice extracellulare e con le cellule di supporto (200). Nel nostro studio abbiamo osservato un aumento significativo di MVD e una maggiore espressione di VEGF / HIF-1α nelle cellule endoteliali nel fronte invasivo del tumore

rispetto alle cellule intratumorali nei POM; viceversa nel melanoma cutaneo non abbiamo osservato differenze significative nell'espressione di VEGF tra i due compartimenti. Tuttavia, è stata identificata una famiglia di isoforme di VEGF che differiscono per la porzione C-terminale (genericamente indicata come VEGFxxxb) (201) (202), che non sembrerebbe stimolare la proliferazione o la migrazione delle cellule endoteliali; sembrerebbe che ali isoforme siano sottoregolate nei tumori renali e nel melanoma metastatico (203) (204). Altri studi hanno dimostrato che in particolare il VEGF 165b può esercitare la sua azione impedendo ai fattori di crescita endoteliali secreti dal tumore di agire sulle cellule endoteliali microvascolari (205). Il fenotipo vascolare nell'angiogenesi sia patologica che fisiologica può dipendere dall'equilibrio delle isoforme di VEGF attraverso la regolazione dello splicing del gene VEGF. Un cambiamento nell'espressione di VEGF che consente alle isoforme proangiogeniche VEGFxxx di dominare all'interno di un tessuto tumorale, consente allo stesso tumore di sviluppare strutture che garantiscano un proprio apporto di sangue con un comportamento più aggressivo. Questo potrebbe spiegare i nostri dati che non mostrano una chiara relazione tra l'espressione di VEGF e l'angiogenesi. Potremmo ipotizzare un diverso controllo dello splicing all'estremità C-terminale del gene VEGF nel melanoma orale e cutaneo. L'ipossia è coinvolta in diversi processi pato-fisiologici tra cui la crescita dei tumori maligni ed è noto che l'espressione di VEGF è indotta nelle cellule tumorali dall'ipossia (206). HIF-1α è comune in molti tipi di tumori umani ed è associato a una prognosi sfavorevole e ad una scarsa risposta al trattamento (207). Nel nostro studio abbiamo osservato che nel POM, i vasi positivi per HIF-1α nel margine invasivo del tumore erano aumentati rispetto alla zona intratumorale, mentre nel melanoma cutaneo non abbiamo osservato alcuna differenza significativa nell'espressione di HIF-1α tra il margine invasivo e la zona intratumorale. La sovraregolazione universale dei marker ipossici al margine del tumore suggerisce che è il margine piuttosto che il centro ad essere più sensibile alle influenze ipossiche del microambiente tumorale (208). I nostri dati clinici confermano l'esito peggiore della POM rispetto al melanoma cutaneo. Ciò potrebbe essere dovuto alle differenze

nel loro comportamento istologico o, alla diagnosi tardiva o alle caratteristiche anatomiche dei POM.

Nei melanomi cutanei esistono differenze ben note nel comportamento biologico del melanoma in fase di crescita radiale, in fase di crescita verticale e in fase di crescita verticale con metastasi (209). Se questa correlazione tra fenotipo istologico e comportamento biologico è coerente nel melanoma cutaneo, la storia naturale dei POM fornisce l'evidenza di un comportamento biologico più anomalo e imprevedibile, non coerente con il fenotipo istologico. Infatti, i melanomi in fase di crescita radiale del cavo orale non tendono ad invadere il derma reticolare sottostante, ma sono associati a metastasi. I melanomi in fase di crescita verticale, sebbene invasivi, devono acquisire alcune capacità prima che possano verificarsi successive metastasi (210). Infatti, molti POM hanno una somiglianza istologica con la lentigo maligna melanoma nella sua fase di crescita radiale; tuttavia, una volta che inizia l'invasione, le lesioni orali sono molto aggressive e possono metastatizzare in modo simile alla fase di crescita verticale del melanoma a diffusione superficiale (211). Infatti, nel POM l'elevata tendenza a invadere in profondità, le metastasi ematogene precoci e la difficoltà di ottenere margini chirurgici liberi da malattia, sono state indicate come caratteristiche che possono spiegare la sua prognosi infausta. L'elevata attività angiogenica e la sovraespressione di VEGF / HIF-1α riscontrate nel fronte invasivo del tumore nella mucosa orale potrebbero svolgere un ruolo chiave nella sua aggressività.

In conclusione, i nostri risultati hanno mostrato una reale differenza biologica tra il melanoma della cute rispetto a quello delle mucose e hanno sottolineato l'importanza del margine invasivo nella biologia del POM. Tale margine è l'area che risponde maggiormente all'ambiente ipossico e la sua capacità di aumentare l’espressione di VEGF e HIF-1α ha un impatto significativo sull'invasività delle cellule di melanoma. Recentemente, sono state trovate caratteristiche molecolari distinte nei melanomi delle mucose che li differenziano dalla loro controparte cutanea, suggerendo che il POM

potrebbe essere considerato un'entità separata dal melanoma con diversi approcci prognostici e terapeutici (212). Sebbene la terapia standard per il melanoma primitivo della mucosa orale continui ad essere la resezione chirurgica, la chemioterapia e la radioterapia possono essere utilizzate come trattamento adiuvante ma, sfortunatamente, con scarso successo. L'attività degli agenti mirati contro la via di segnalazione del VEGF nel melanoma è stata studiata in diversi studi di fase I / II. Molta attenzione è stata dedicata alla sperimentazione di Fase I / II di carboplatino, taxolo e sorafenib (Nexavar, Bayer Pharmaceuticals Corporation, West Haven, CT e Onyx Pharmaceuticals, Emeryville, CA), un inibitore della multi-tirosin chinasi con attività contro le vie di segnalazione sia della MAP chinasi che del VEGF-R2. Risultati preliminari indicano risposte parziali in 11 dei 32 pazienti valutabili, con 19 pazienti aggiuntivi che mostrano come migliore risposta la stabilizzazione della malattia (213). Ulteriori studi in corso su nuovi agenti che prendono di mira VEGF e i suoi recettori includono anche lo studio di Vernolide-A (214) che nelle cellule di melanoma B16F-10 inibisce l'angiogenesi tumorale regolando HIF-1α, MMP-2, MM-9 e VEGF.

L'elevata attività angiogenica e l'elevata espressione endoteliale di VEGF e HIF-1α da noi riscontrata nel fronte invasivo del melanoma nella mucosa orale possono avere importanti implicazioni nella POM per la progettazione futura di studi clinici che utilizzano agenti mirati contro la via del VEGF. Sono necessari studi più ampi per supportare i nostri risultati.

Bibliografia

1. Delfino G, Lanciotti E, Liguri G, Stefani M. Medicina e Biologia – Medicine & Biology. s.l. : Zanichelli Editore, 2012.

2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. GLoBoCaN 2008, Cancer incidence and mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10(internet). Lyon, France: international agency for Research on Cancer; 2010 : s.n.

3. Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends., Clin Dermatol. 2009 Jan-Feb;27(1):3-9.

4. I numeri del Cancro in Italia. Rapporto AIOM-AIRTUM 2019.

5. Arrangoiz R, Dorantes J, Cordera F, et al. Melanoma review: epidemiology, risk factors, diagnosis and staging. *J Cancer Treat Res. 2016;4(1):1-15.*

6. Usher-Smith JA, Emery J, Kassianos AP, et al. Risk prediction models for melanoma: a systematic review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014;23(8): 1450-1463.

7. Vuong K, McGeechan K, Armstrong BK, et al. Risk prediction models for incident primary cutaneous melanoma: a systematic review. JAMA Dermatol. 2014;150(4):434-444.

8. Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. Int J Cancer. 1997;73(2):198-203.

9. Volkovova K, Bilanicova D, Bartonova A, et al. Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. Environ Health. 2012; 11(suppl 1):S12.

10. Bald T, Quast T, Landsberg J, et al. Ultravioletradiation-induced inflammation promotes angiotropism and metastasis in melanoma. Nature. 2014; 507(7490):109-113.

11. Ransohoff KJ, Jaju PD, Tang JY, et al. Familial skin cancer syndromes: increased melanoma risk. J Am Acad Dermatol. 2016;74(3):423-434.

12. Bauer J, Garbe C. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. Pigment Cell Res. 2003;16(3):297-306.

13. Tucker MA, Halpern A, Holly EA, et al. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. JAMA. 1997;277(18):1439-1444.

14. Vourc'h-Jourdain M, Martin L, Barbarot S, et al. Large congenital melanocytic nevi: therapeutic management and melanoma risk: a systematic review. J Am Acad Dermatol. 2013;68(3):493-498,e1-e14.

15. Tromberg J, Bauer B, Benvenuto-Andrade C, et al. Congenital melanocytic nevi needing treatment. Dermatol Ther. 2005;18(2):136-150.

16. Niendorf KB, Tsao H. Cutaneous melanoma: family screening and genetic testing. Dermatol Ther. 2006; 19(1):1-8.

17. Ransohoff KJ, Jaju PD, Tang JY, et al. Familial skin cancer syndromes: increased melanoma risk. J Am Acad Dermatol. 2016;74(3):423-434.

18. MA, Melhman. Casual relationship from exposure to chemicals in oil refining and chemical industries and malignant melanoma. Ann NY Acad Sci 2006 Sep; 1076:822-8.

19. T., Sorahan. Mortality of UK oil refinery and petroleum distribution workers, 1951-2003 Occup Med (Lond) 2007 May; 57(3):177-85. 18.

20. Villano CM, Murphy KA, Akintobi A, White LA,. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p- dioxin (TCDD) induces matrix metalloproteinase (MMP) expression and invasion in A2058 melanoma cells. Toxicol Appl Pharmacol 2006 Feb 1; 210(3):212-24.19.

21. Comba P, Ricci P, Iavarone I, Pirastu R, et al. ISS-AIRTUM Working Group for the study of cancer incidence in contaminated sites. Cancer incidence in Italian contaminated sites. Ann Ist Super Sanita. 2014; 50(2):186-91.

22. Wu S, Han J, Feskanich D et al. Citrus Consumption and Risk of Cutaneous Malignant Melanoma. J Clin Oncol. 2015 Jun 29. Epub ahead of print.

23. Swick JM, Maize JC Sr. Molecular biology of melanoma.; J Am Acad Dermatol.; 2012 Nov;67(5):1049-54.

24. Sullivan RJ, Fisher DE. Understanding the biology of melanoma and therapeutic implications.; Hematol Oncol Clin North Am. 2014 Jun; 28(3): 437–453.

25. Cartlidge RA, Thomas GR, Cagnol S et al. Oncogenic BRAF(V600E) inhibits BIM expression to promote melanoma cell survival.; Pigment Cell Melanoma Res. 2008 Oct;21(5):534-44.

26. Kwong LN, Davies MA. Navigating the therapeutic complexity of PI3K pathway inhibition in melanoma.; Clin Cancer Res. 2013 Oct 1;19(19):5310-9.

27. Maertens O, Johnson B, Hollstein P et al. Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis.; Cancer Discov. 2013 Mar;3(3):338-49.

28. Davies H, Bignell GR, Cox C et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer.; Nature. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.

29. Greaves WO, Verma S, Patel KP et al. Frequency and spectrum of BRAF mutations in a retrospective, single-institution study of 1112 cases of melanoma.; J Mol Diagn. 2013 Mar;15(2):220-6.

30. Jakob JA, Bassett RL Jr, Ng CS et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma.; Cancer. 2012 Aug 15;118(16):4014-23.

31. Carlino MS, Haydu LE, Kakavand H et al. Correlation of BRAF and NRAS mutation status with outcome, site of distant metastasis and response to chemotherapy in metastatic melanoma.; Br J Cancer. 2014 Jul 15;111(2):292-9.

32. Menzies AM, Haydu LE, Visintin L. Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma.; Clin Cancer Res. 2012 Jun 15;18(12):3242-9.

33. Akbani R, Akdemir, KC, Aksoy BA et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma.; Cell. 2015 Jun, Volume 161 , Issue 7 , 1681 – 1696.

34. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS et al. High frequency of BRAF mutations in nevi.; Nat Genet. 2003 Jan;33(1):19-20.

35. Landi MT, Bauer J, Pfeiffer RM et al. MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma.; Science. 2006 Jul 28;313(5786):521-2.

36. Fargnoli MC, Pike K, Pfeiffer RM. MC1R variants increase risk of melanomas harboring BRAF mutations.; J Invest Dermatol. 2008 Oct;128(10):2485-90.

37. Colombino M, Capone M, Lissia A et al. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma.; J Clin Oncol. 2012 Jul 10;30(20):2522-9.

38. Jakob JA, Bassett RL Jr, Ng CS et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma.; Cancer. 2012 Aug 15;118(16):4014-23.

39. Fedorenko IV, Gibney GT, Smalley KS. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management.; Oncogene. 2013 Jun 20;32(25):3009-18.

40. Swick JM, Maize JC Sr. Molecular biology of melanoma.; J Am Acad Dermatol.; 2012 Nov;67(5):1049-54.

41. Alexeev V, Yoon K. Distinctive role of the cKit receptor tyrosine kinase signaling in mammalian melanocytes.; J Invest Dermatol. 2006 May;126(5):1102-10.

42. Handolias D, Salemi R, Murray W, et al. Mutations in KIT occur at low frequency in melanomas arising from anatomical sites associated with chronic and intermittent sun exposure.; Pigment Cell Melanoma Res. 2010 Apr;23(2):210-5.

43. Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes.; Clin Cancer Res. 2008 Nov 1;14(21):6821-8.

44. Curtin JA, Busam K, Pinkel D et al. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma., J Clin Oncol. 2006 Sep 10;24(26):4340-6.

45. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi.; Nature. 2009 Jan 29;457(7229):599-602.

46. Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB et al. Mutations in GNA11 in uveal melanoma.; N Engl J Med. 2010 Dec 2;363(23):2191-9.

47. Maertens O, Johnson B, Hollstein P et al. Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis.; Cancer Discov. 2013 Mar;3(3):338-49.

48. Akbani R, Akdemir, KC, Aksoy BA et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma.; Cell. 2015 Jun, Volume 161 , Issue 7 , 1681 – 1696.

49. Krauthammer M, Kong Y, Bacchiocchi A et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas.; Nat Genet. 2015 Sep;47(9):996-1002.

50. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor.; Nat Rev Mol Cell Biol. 2012 Apr 4;13(5):283-96.

51. Glitza IC, Davies MA. Genotyping of cutaneous melanoma.; Chin Clin Oncol. 2014 Sep;3(3):27.

52. Hsiao JJ, Fisher DE. The roles of microphthalmia-associated transcription factor and pigmentation in melanoma.; Arch Biochem Biophys. 2014 Dec 1;563:28-34.

53. Paillerets BB, Lesueur F, Bertolotto C. A germline oncogenic MITF mutation and tumor susceptibility. Eur J Cell Biol. 2014 Jan-Feb;93(1-2):71-5.

54. Hansen CB, Wadge LM, Lowstuter K, et al. Clinical germline genetic testing for melanoma. Lancet Oncol. 2004;5(5):314-319.

55. Sharpless E, Chin L. The INK4a/ARF locus and melanoma. Oncogene. 2003;22(20):3092-3098.

56. Nagore E, Oliver V, Moreno-Picot S, et al. Primary cutaneous melanoma in hidden sites is associated with thicker tumours—A study of 829 patients. Eur J Cancer. 2001;37(1):79-82.

57. Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. CA Cancer J Clin. 1985;35(3):130-151.

58. Abbasi NR, Shaw HM, Rigel DS, et al. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. JAMA. 2004;292(22):2771-2776.

59. Whited JD, Grichnik JM. The rational clinical examination Does this patient have a mole or a melanoma? JAMA. 1998;279(9):696-701.

60. Gachon J, Beaulieu P, Sei JF, et al. First prospective study of the recognition process of melanoma in dermatological practice. Arch Dermatol. 2005;141(4):434-438.

61. Vestergaard ME, Macaskill P, Holt PE, et al. 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;159(3):669-676.

62. Bafounta ML, Beauchet A, Aegerter P, et al. Is dermoscopy (epiluminescence microscopy) useful for the diagnosis of melanoma? Results of a meta-analysis using techniques adapted to the evaluation of diagnostic tests. Arch Dermatol. 2001;137(10):1343-1350.

63. Tran KT, Wright NA, Cockerell CJ. Biopsy of the pigmented lesion—when and how. J Am Acad Dermatol. 2008;59(5):852-871.

64. Martin RC 2nd, Scoggins CR, Ross MI, et al. Is incisional biopsy of melanoma harmful? Am J Surg. 2005;190(6):913-917.

65. Davis IJ, Kim JJ, Ozsolak F. Oncogenic MITF dysregulation in clear cell sarcoma: defining the MiT family of human cancers. Cancer Cell. 2006;9(6):473-484.

66. Ramos-Herberth FI, Karamchandani J, Kim J, et al. SOX10 immunostaining distinguishes desmoplastic melanoma from excision scar. J Cutan Pathol. 2010;37(9):944-952.

67. Gogas H, Eggermont AM, Hauschild A, et al. Biomarkers in melanoma. Ann Oncol. 2009;20(suppl 6):vi8-vi13.

68. Mocellin S, Zavagno G, Nitti D. The prognostic value of serum S100B in patients with cutaneous melanoma: a meta-analysis. Int J Cancer. 2008;123(10):2370-2376.

69. Bafounta ML, Beauchet A, Chagnon S, et al. Ultrasonography or palpation for detection of melanoma nodal invasion: a meta-analysis. Lancet Oncol. 2004;5(11):673-680.

70. Valsecchi ME, Silbermins D, de Rosa N, et al. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in patients with melanoma: a meta-analysis. J Clin Oncol. 2011;29(11):1479-1487.

71. Warycha M, Zakrzewski J, Ni Q, et al. Metaanalysis of sentinel lymph node positivity in thin melanoma (.

72. Kretschmer L, Starz H, Thoms KM, et al. Age as a key factor influencing metastasizing patterns and disease-specific survival after sentinel lymph node biopsy for cutaneous melanoma. Int J Cancer. 2011;129(6):1435-1442.

73. Kunte C, Geimer T, Baumert J, et al. Prognostic factors associated with sentinel lymph node positivity and effect of sentinel status on survival: an analysis of 1049 patients with cutaneous melanoma. Melanoma Res. 2010;20(4):330-337.

74. McMasters KM, Reintgen DS, Ross MI, et al. Factors that predict the presence of sentinel lymph node metastasis in patients with melanoma. Surgery. 2001; 130(2):151-156.

75. Gutzmer R, Satzger I, Thoms KM, et al. Sentinel lymph node status is the most important prognostic factor for thick (> or = 4 mm) melanomas. J Dtsch Dermatol Ges. 2008;6(3):198-203.

76. Morton DL, Wen DR, Wong JH, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. Arch Surg. 1992;127(4):392-399.

77. Thompson JF, Shaw HM, Hersey P, et al. The history and future of melanoma staging. J Surg Oncol. 2004;86(4):224-235.

78. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. J Clin Oncol. 2009;27(36):6199-6206.

79. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. J Clin Oncol. 2001;19(16):3622-3634.

80. Eggermont AM, Chiarion-Sileni V, Grob JJ, et al. Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomised, double-blind, phase 3 trial. Lancet Oncol. 2015;16(5):522-530.

81. Eggermont AM, Spatz A, Lazar V, et al. Is ulceration in cutaneous melanoma just a prognostic and predictive factor or is ulcerated melanoma a distinct biologic entity? Curr Opin Oncol. 2012;24(2):137-140.

82. Azzola MF, Shaw HM, Thompson JF, et al. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. Cancer. 2003;97(6):1488-1498.

83. Paek SC, Griffith KA, Johnson TM, et al. The impact of factors beyond Breslow depth on predicting sentinel lymph node positivity in melanoma. Cancer. 2007;109(1):100-108.

84. Stucky CC, Gray RJ, Dueck AC, et al. Risk factors associated with local and in-transit recurrence of cutaneous melanoma. Am J Surg. 2010;200(6):770-774.

85. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. Ann Surg Oncol. 2010;17(6):1471-1474.

86. Elder DE, Gimotty PA, Guerry D. Cutaneous melanoma: estimating survival and recurrence risk based on histopathologic features. Dermatol Ther. 2005; 18(5):369-385.

87. Weiss SA, Han SW, Lui K, et al. Immunologic heterogeneity of tumor infiltrating lymphocyte composition in primary melanoma. Hum Pathol. 2016;57:116-125.

88. Tas F, Erturk K. Presence of histological regression as a prognostic factor in cutaneous melanoma patients. Melanoma Res. 2016;26(5):492-496.

89. Homsi J, Kashani-Sabet M, Messina JL, et al. Cutaneous melanoma: prognostic factors. Cancer Control. 2005;12(4):223-229.

90. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, et al. Sentinelnode biopsy or nodal observation in melanoma. N Engl J Med. 2006;355(13):1307-1317.

91. Gershenwald JE, Thompson W, Mansfield PF, et al. 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):976-983.

92. Crowley NJ, Seigler HF. Late recurrence of malignant melanoma. Analysis of 168 patients. Ann Surg. 1990;212(2):173-177.

93. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, doubleblind, phase 3 randomised controlled trial. Lancet. 2015;386(9992):444-451.

94. Robert C, Ribas A, Hamid O, et al. Three-year overall survival for patients with advanced melanoma treated with pembrolizumab in Keynote-001 [abstract 9503]. J Clin Oncol. 2016;34(suppl).

95. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. Nat Rev Cancer. 2016;16(6):345-358.

96. Chang P, Knapper WH. Metastatic melanoma of unknown primary. Cancer. 1982;49(6):1106-1111.

97. Schlagenhauff B, Stroebel W, Ellwanger U, et al. Metastatic melanoma of unknown primary origin shows prognostic similarities to regional metastatic melanoma: recommendations for initial staging examinations.Cancer. 1997;80(1):60-65.

98. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, et al. Melanoma staging: evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin. 2017;67(6):472-492.

99. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. N Engl J Med. 2005;353(20):2135-2147.

100. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, et al. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. J Clin Oncol. 2006;24(26):4340-4346.

101. Torres-Cabala CA, Wang WL, Trent J, et al. Correlation between KIT expression and KIT mutation in melanoma: a study of 173 cases with emphasis on the acral-lentiginous/mucosal type. Mod Pathol. 2009;22(11):1446-1456.

102. Shain AH, Garrido M, Botton T, et al. Exome sequencing of desmoplastic melanoma identifies recurrent NFKBIE promoter mutations and diverse activating mutations in the MAPK pathway. Nat Genet. 2015;47(10): 1194-1199.

103. Wiesner T, Kiuru M, Scott SN, et al. NF1 Mutations are common in desmoplastic melanoma. Am J Surg Pathol. 2015;39(10):1357-1362.

104. McLaughlin CC, Wu XC, Jemal A, et al. Incidence of noncutaneous melanomas in the U.S. Cancer. 2005;103(5):1000-1007.

105. Cosgarea I, Ugurel S, Sucker A, et al. Targeted next generation sequencing of mucosal melanomas identifies frequent NF1 and RAS mutations. Oncotarget. 2017;8(25):40683-40692.

106. Amit M, Tam S, Abdelmeguid AS, et al. Mutation status among patients with sinonasal mucosal melanoma and its impact on survival. Br J Cancer. 2017;116(12):1564-1571.

107. Öztürk Sari S, Yilmaz I, Taskin OÇ, et al. BRAF, NRAS, KIT, TERT, GNAQ/GNA11 mutation profile analysis of head and neck mucosal melanomas: a study of 42 cases. Pathology. 2017;49(1):55-61.

108. Hou JY, Baptiste C, Hombalegowda RB, et al. Vulvar and vaginal melanoma: a unique subclass of mucosal melanoma based on a comprehensive molecular analysis of 51 cases compared with 2253 cases of nongynecologic melanoma. Cancer. 2017;123(8): 1333-1344.

109. Yang HM, Hsiao SJ, Schaeffer DF, et al. Identification of recurrent mutational events in anorectal melanoma. Mod Pathol. 2017;30(2):286-296.

110. Magro CM, Crowson AN, Mihm MC. Unusual variants of malignant melanoma. Mod Pathol. 2006; 19(suppl 2):S41-S70.

111. Ludgate MW, Fullen DR, Lee J, et al. The atypical Spitz tumor of uncertain biologic potential: a series of 67 patients from a single institution. Cancer. 2009;115(3): 631-641.

112. Wiesner T, Kutzner H, Cerroni L, et al. Genomic aberrations in spitzoid melanocytic tumours and their implications for diagnosis, prognosis and therapy. Pathology. 2016;48(2):113-131.

113. Chattopadhyay C, Kim DW, Gombos DS, et al. Uveal melanoma: from diagnosis to treatment and the science in between. Cancer. 2016;122(15):2299-2312.

114. Thomas S, Pütter C, Weber S, et al. Prognostic significance of chromosome 3 alterations determined by microsatellite analysis in uveal melanoma: a long-term follow-up study. Br J Cancer. 2012;106(6): 1171-1176.

115. Woodward JK, Elshaw SR, Murray AK, et al. Stimulation and inhibition of uveal melanoma invasion by HGF, GRO, IL-1alpha and TGF-beta. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002;43(10):3144-3152.

116. Sladden MJ, Balch C, Barzilai DA, et al. Surgical excision margins for primary cutaneous melanoma. Cochrane Database Syst Rev. 2009;(4):CD004835.

117. Hayes AJ, Maynard L, Coombes G, et al. UK Melanoma Study Group; British Association of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgeons; Scottish Cancer Therapy Network: wide versus narrow excision margins for high-risk, primary cutaneous melanomas: long-term follow-up of survival in a randomise.

118. Veronesi U, Cascinelli N. Narrow excision (1-cm margin). A safe procedure for thin cutaneous melanoma. Arch Surg. 1991;126(4):438-441.

119. Cohn-Cedermark G, Rutqvist LE, Andersson R, et al. Long term results of a randomized study by the Swedish Melanoma Study Group on 2-cm versus 5-cm resection margins for patients with cutaneous melanoma with a tumor thickness of 0.8-2.0 mm. Cancer. 2000;89(7):1495-1501.

120. McLeod M, Choudhary S, Giannakakis G, et al. Surgical treatments for lentigo maligna: a review. Dermatol Surg. 2011;37(9):1210-1228.

121. Morton DL, Cochran AJ, Thompson JF, et al. Sentinel node biopsy for early-stage melanoma: accuracy and morbidity in MSLT-I, an international multicenter trial. Ann Surg. 2005;242(3):302-311.

122. Young SE, Martinez SR, Faries MB, et al. Can surgical therapy alone achieve long-term cure of melanoma metastatic to regional nodes? Cancer J. 2006;12(3):207-211.

123. Bender C, Hassel JC, Enk A. Immunotherapy of melanoma. Oncol Res Treat. 2016;39(6):369-376.

124. Hassel JC, Winnemöller D, Schartl M, et al. STAT5 contributes to antiapoptosis in melanoma. Melanoma Res. 2008;18(6):378-385.

125. Wellbrock C, Weisser C, Hassel JC, et al. STAT5 contributes to interferon resistance of melanoma cells. Curr Biol. 2005;15(18):1629-1639.

126. Ortiz A, Fuchs SY. Anti-metastatic functions of type 1 interferons: Foundation for the Adjuvant Therapy of Cancer. Cytokine. 2016;S1043-4666(16)30010-2.

127. Agrawal S, Kane JM 3rd, Guadagnolo BA, et al. The benefits of adjuvant radiation therapy after therapeutic lymphadenectomy for clinically advanced, high-risk, lymph node-metastatic melanoma. Cancer. 2009;115(24):5836-5844.

128. Bibault JE, Dewas S, Mirabel X, et al. Adjuvant radiation therapy in metastatic lymph nodes from melanoma. Radiat Oncol. 2011;6(Web Page):12.

129. Strojan P, Jancar B, Cemazar M, et al. Melanoma metastases to the neck nodes: role of adjuvant irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010;77(4):1039-1045.

130. Burmeister BH, Henderson MA, Ainslie J, et al. Adjuvant radiotherapy versus observation alone for patients at risk of lymph-node field relapse after therapeutic lymphadenectomy for melanoma: a randomised trial. Lancet Oncol. 2012;13(6):589-597.

131. Chadha M, Hilaris B, Nori D, et al. Role of brachytherapy in malignant melanoma: a preliminary report. J Surg Oncol. 1990;43(4):223-227.

132. Overgaard J, Gonzalez Gonzalez D, Hulshof MC, et al. Hyperthermia as an adjuvant to radiation therapy of recurrent or metastatic malignant melanoma. A multicentre randomized trial by the European Society for Hyperthermic Oncology. Int J Hyperthermia. 2009; 25(Web Page):323-334.

133. Weide B, Eigentler TK, Pflugfelder A, et al. Survival after intratumoral interleukin-2 treatment of 72 melanoma patients and response upon the first chemotherapy during follow-up. Cancer Immunol Immunother. 2011;60(4):487-493.

134. Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, et al. Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma. J Clin Oncol. 2015;33(25):2780-2788.

135. Mali B, Jarm T, Snoj M, et al. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy: a systematic review and meta-analysis. Eur J Surg Oncol. 2013;39(1):4-16.

136. Grunhagen DJ, de Wilt JH, van Geel AN, et al. Isolated limb perfusion for melanoma patients—a review of its indications and the role of tumour necrosis factoralpha. Eur J Surg Oncol. 2006;32(4):371-380.

137. Thompson JF, Kam PC. Isolated limb infusion for melanoma: a simple but effective alternative to isolated limb perfusion. J Surg Oncol. 2004;88(1):1-3.

138. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, et al. Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. J Clin Oncol. 2015;33(17):1889-1894.

139. Tagawa ST, Cheung E, Banta W, et al. Survival analysis after resection of metastatic disease followed by peptide vaccines in patients with Stage IV melanoma. Cancer. 2006;106(6):1353-1357.

140. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. Nature. 2007;450(7171):903-907.

141. Kalialis LV, Drzewiecki KT, Klyver H. Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. Melanoma Res. 2009;19(5):275-282.

142. Thomas NE, Busam KJ, From L, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. J Clin Oncol. 2013;31(33):4252-4259.

143. Robbins HA, Clarke CA, Arron ST, et al. Melanoma risk and survival among organ transplant recipients. J Invest Dermatol. 2015;135(11):2657-2665.

144. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med. 2010;363(8):711-723.

145. Robert C, Long GV, Brady B, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. N Engl J Med. 2015;372(4):320-330.

146. Gandini S, Massi D, Mandalà M. PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: a systematic review and meta-analysis. Crit Rev Oncol Hematol. 2016;100:88-98.

147. Daud A, Hamid O, Robert C, et al. Relationship between PD-L1 expression and efficacy in 655 patients with melanoma treated with pembrolizumab (MK-3475). Society for Melanoma Research Annual Meeting; San Francisco, CA; November 18-21, 2015.

148. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. N Engl J Med. 2015;373(13): 1270-1271.

149. Zimmer L, Vaubel J, Mohr P, et al. Phase II DeCOGstudy of ipilimumab in pretreated and treatmentnaïve patients with metastatic uveal melanoma. PLoS One. 2015;10(3):e0118564.

150. Hassel JC, Heinzerling L, Aberle J, et al. Combined immune checkpoint blockade (anti-PD-1/anti-CTLA-4): evaluation and management of adverse drug reactions. Cancer Treat Rev. 2017;57:36-49.

151. Hua C, Boussemart L, Mateus C, et al. Association of vitiligo with tumor response in patients with metastatic melanoma treated with pembrolizumab. JAMA Dermatol. 2016;152(1):45-51.

152. Sanlorenzo M, Vujic I, Daud A, et al. Pembrolizumab cutaneous adverse events and their association with disease progression. JAMA Dermatol. 2015;151(11):1206-1212.

153. Kaunitz GJ, Loss M, Rizvi H, et al. Cutaneous eruptions in patients receiving immune checkpoint blockade: clinicopathologic analysis of the nonlichenoid histologic pattern. Am J Surg Pathol. 2017; 41(10):1381-1389.

154. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. J Clin Oncol. 1999;17(7):2105-2116.

155. Lo JA, Fisher DE. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. Science. 2014;346(6212):945-949.

156. Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U, 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):2823-2830.

157. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. N Engl J Med. 2005;353(20):2135-2147.

158. Egberts F, Gutzmer R, Ugurel S, et al.

159. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. BRIM-3 Study Group: improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. N Engl J Med. 2011;364(26):2507-2516.

160. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. Lancet. 2012;380(9839):358-365.

161. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. N Engl J Med. 2012;366:707-714.

162. Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, et al. Dermatologic Cooperative Oncology Group of Germany (DeCOG): the genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. Cancer Discov. 2014;4(1):94-109.

163. Su F, Viros A, Milagre C, et al. RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. N Engl J Med. 2012; 366(3):207-215.

164. Hassel JC, Groesser L, Herschberger E, et al. RAS mutations in benign epithelial tumors associated with BRAF inhibitor treatment of melanoma. J Invest Dermatol. 2015;135(2):636-639.

165. Lutzky J, Bauer J, Bastian BC. Dose-dependent, complete response to imatinib of a metastatic mucosal melanoma with a K642E KIT mutation. Pigment Cell Melanoma Res. 2008;21(4):492-493.

166. Hodi FS, Friedlander P, Corless CL, et al. Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma. J Clin Oncol. 2008;26(12):2046-2051.

167. Guo J, Si L, Kong Y. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. J Clin Oncol. 2011;29(21):2904-2909.

168. Lee SJ, Kim TM, Kim YJ, et al. Phase II trial of nilotinib in patients with metastatic malignant melanoma harboring KIT gene aberration: a multicenter trial of Korean Cancer Study Group (UN10-06). Oncologist. 2015;20(11):1312-1319.

169. Tarhini AA, Agarwala SS. Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. Dermatol Ther. 2006;19(1):19-25.

170. Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, 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):158-166.

171. Eigentler TK, Caroli UM, Radny P, et al. Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. Lancet Oncol. 2003;4(12):748-759.

172. Group., Collaborative Ocular Melanoma Study. The Collaborative Ocular Melanoma Study Group (COMS) randomized trial of I125 brchytherapy for medium choroidal melanoma I: visual acuity after 3 year. COMS report n°16. Ophtalmology 2001; 108:348-355.

173. —. The Collaborative Ocular Melanoma Study Group (COMS) randomized trial of I125 brachytherapy for medium choroidal melanoma. IV: local treatment failure and enucleation in the first 5 years after brachytherapy. COMS report n°19. Ophtalmology 2002; 109:2197-.

174. C.M., Hicks M.J. and Flaitz. Oral mucosal melanoma: epidemiology and pathobiology. Oral Oncol. 36, 152-169.

175. Laurenco S.V., Sangüeza A.M., Sotto M.N., Bologna S.B., Giacomo T.B., Buim M.E., Coutinho-Camillo C.M., Silva S.D., Landman G., Soares F.A. and Simonsen Nico M.M. Primary oral mucosa melanoma: a series of 35 new cases from South America. Am. J.

176. P., Hashemi. Malignant melanoma of the oral cavity: a review of the literature. Indian J. of dental res. 19, 47-51. .

177. Boring C.C., Squires T..S, Tong T. and Montgomery S. Cancer statistics. CA Cancer J. Clin. 44, 7-26. .

178. Sortino Rachou A.M., de Camargo Cancela M., Voti L. and Curado MP. Primary oral melanoma: population based incidence . Oral Oncology 45, 254-258.

179. Freedberg I.M., Eisen A.Z., Wolff K. In: Dermatology in general medicine. McGraw-Hill. 5th ed. Goldsmith L.A., Katz S.I. and Fitzpatrick T.B. (eds). New York. pp. 133-143. .

180. H.J., Tomicic J. and Wanebo. Mucosal melanomas. Surg. Clin. North. Am. 83, 237-252.

181. R.J., Patrick. Primary mucosal melanoma J. Am. Acad. Dermatol. 56, 818-834.

182. J., Folkman. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N. Engl. J. Med. 285, 1182-1186. .

183. —. Clinical applications of research on angiogenesis. N. Engl. J. Med. 333, 1757-1763.

184. Uzzan B., Nicolas P., Cucherat M. and Perret G.Y. Microvessel density as a prognostic factor in woman with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. Cancer Res. 64, 2941-2955. .

185. Ushijima C., Tsukamoto S., Yamazaki K., Yoshino I., Sugio K. and Sugimachi K. High vascularity in the peripheral region of non small cell lung cancer tissue is associated with tumor progression. Lung Cancer 34, 233-241.

186. Ribatti D., Ennas M.G., Vacca A., Ferreli F., Nico B., Orru S. and Sirigu P. Tumor vascularity and tryptase-positive mast cell correlate with a poor prognosis in melanoma. Eur. J. Clin. Invest. 33, 420-425.

187. Simmons D.L., Satterthwaite A.B., Tenen D.G. and Seed B. Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. The Journal of Immunology 148, 267-271.

188. Miettinen M., Lindenmayer A. and Chaubal A. Endothelial cell markers CD31, CD34, and BNH9 antibody to H- and Y-antigens-evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Willibrand fac.

189. Fina L., Molgaard H., Robertson D., Bradley N.J., Monaghan P., Delia D., Sutherland D.R., Baker M.A.and Greaves M.F. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. Blood 75, 2417-2426.

190. K.M., Nielsen J.S.and McNagny. Novel functions of the CD34 family. J. Cell Sci. 121, 3683-689.

191. Reed J.A., McNutt N.S. and Albino A.P. Differential expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in melanocytic lesions demonstrated by in situ hybridization: Implications for tumor progress. Am. J. Pathol. 144, 329-336.

192. Khare V.K., Albino A.P. and Reed J.A. The neuropeptide/mast cell secretagogue substance P is expressed in cutaneous melanocytic lesions. J. Cutan. Pathol. 25, 2-10.

193. Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M. and Dvorak A.M. Vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am. J. Pathol. 146, 1029-1039.

194. Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S. and Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor. F.A.S.E.B. J. 13, 9-22.

195. Conn G., Bayne M.L., Soderman D.D., Kwok P.W., Sullivan K.A., Palisi T.M., Hope D.A. and Thomas K.A. Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. Proc. Natl. Acad. S.

196. Ferrara N., Houk K., Jakeman L. and Leung D.W. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. Endocrinol Rev. 13, 18-32.

197. O'Rourke .JF., Dachs G.U., Gleadle J.M., Maxwell P.H., Pugh C.W., Stratford I.J., Wood S.M. and Ratcliffe P.J. 35. O'Rourke .JF., Dachs G.U., Gleadle J.M., Maxwell P.H., Pugh C.W.Hypoxia response elements. Oncol. Res. 9, 327-332.

198. T.J., Goldberg M.A. and Schneider. Similarities between the oxygen- sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. J. Biol. Chem. 269, 4355-4359.

199. Forsythe J.A., Jjang B.-H., Iyer N.V. Agani F., Leung S.W., Koos R.D. and Semenza G.L. Activation of vascular endothelial growth factor gene trascription by hypoxia-inducible factor 1. Mol. Cell Bio. 16, 4604-4613.

200. Giatromanolaki A., Siuridis E. and Koukourakis M.I. Tumour angiogenesis: vascular growth and survival. A.P.M.I.S . 122, 431-440.

201. G., Lever W.F. and Schaumburg-Lever. In: Histopathology of the Skin. 7th ed. J.B.Lippincott, Philadelphia. Pp 756-805.

202. Holash J., Wiegand S.J. and Yancopoulos G.D. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. Oncogene 18, 5356- 5362. .

203. Raiaganeshan R., Prasad R., Guillou P.J., Scott N., Poston G. and Jaine D.G. Expression patterns of hypoxic markers at the invasive margin of colorectal cancers and liver metastases. Eur. J. Surg. Oncol. 35, 1286-1294.

204. M., Paweletz N. and Kneirim. Tumour related angiogenensis. Crit. Rev. Oncol. Haematol. 9, 197-242.

205. Lee Y.J., Nagai N., Siar C.H., Nakano K., Nagatsuka H., Tsujigiwa H., Roan CH.and Gunduz M. Angioarchitecture of primary oral malignant melanomas. J. Histochem. Cytochem. ; 50,1555-1562.

206. Maniotis A.J., Folberg R., Hess A., Seftor E.A., Gardner L.M., Pe'er J., Trent J.M., Meltzer P.S. and Hendrix M.J. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. Am. J. Pathol. 155, 739-752.

207. Hendrix M.J.C., Seftor E.A., Hess A.R. and Seftor R.E. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. Nature Review/Cancer 3: 4111-4121.

208. A., Folberg R. and Maniotis. Vasculogenic mimicry. A.P.M.I.S. 112, 508-25.

209. Hashizume H., Baluk P., Morikawa S., McLean J.W., Thurston G., Roberge S., Jain R.K. and McDonald D.M. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. Am. J. Pathol. 156,1363–1380.

210. J., Folkman. Can mosaic tumor vessels facilitate molecular diagnosis of cancer? Proc. Na.t Acad. Sci. USA 98, 398–400. .

211. Foss A.J.E., Alexander R.A., Jefferies L.W., Hungerford J.L., Harris A.L. and Lightman S. Microvessel count predicts survival in uveal melanoma. Cancer Res. 56, 2900–2903.

212. A., Folberg R. and Maniotis. Vasculogenic mimicry. A.P.M.I.S. 112, 508-25.

213. McDonald D.M., Munn L.and Jain R.K. Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant? Am. J. Pathol. 156, 383-88.

214. Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P., Gersenstein M., Gertsenstein M., Wu X.F., Breitman M.L. and Schuh A.C. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature 376, 62-66. .

215. N., Ferrara. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 237, 1-30.

216. Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vandenhoeck A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W. and Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature 380, 435-439. .

217. Benjamin L.E., Golijanin D., Itin A., Pode D. and Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. Clinical Invest. 103, 159-165.

218. Woolard J., Wang W.Y. and Bevan H.S. VEGF 165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogeneous protein expression. Cancer res. 64, 7822-7835.

219. Perrin R.M., Konopatskaya O., Qui Y., Harper S., Bates D.O. and Churchill A.J. Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti-to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. Diabetologia 48, 2422-2427.

220. Bates D.O., Cui T.G., Doughty J.M., Winkler M., Sugiono M., Shields J.D., Peat D., Gillatt D. and Harper S.J. VEGF 165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is downregulated in renal cell carcinoma. Cancer res. .

221. Pritchard-Jones R.O., Dunn D.B., Qui Y., Varey A.H., Orlando A., Rigby H., Harper SJ. and Bates D.O. Expression of VEGF (xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. Br. J. Cancer 97, 223-230.

222. Rennel E.S., Waine E., Guan H. T., Schüler Y., Leenders W., Woolard J., Sugiono M., Gillatt D., Kleinerman E., Bates D. and Harper S. The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice. Br. J. Cancer 98.

223. Shweiki D., Neeman M., Itin A. and Keshet E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci USA 92, 768−772.

224. Zhong H., De Marzo A.M., Laughner E., Lim M., Hilton D.A., Zagzag D., Buechler P., Isaacs W.B., Semenza G.L. and Simons J.W. Overexpression of Hypoxia-inducible Factor 1 in Common Human Cancers and Their Metastases. Cancer Research 59, 583.

225. Raiaganeshan R., Prasad R., Guillou P.J., Scott N., Poston G. and Jaine D.G. Expression patterns of hypoxic markers at the invasive margin of colorectal cancers and liver metastases. Eur. J. Surg. Oncol. 35, 1286-1294.

226. Mendenhall W.M., Amdu R.J., Hinerman R.W., Werning J.W., Villaret D.B. and Mendenhall N.P. Head and neck mucosal melanoma. Am. J. Clin. Onco.l. 28, 626-630.

227. Femiano .F, Lanza A., Buonaiuto C., Gombos F., Di Spirito F. and Cirillo N. Oral malignant melanoma:a review of the literature. J. Oral Pathol. Med. 37, 383-388.

228. Symvoulakis E.K., Kyrmizakis D.E., Drivas E.I., Koutsopoulos A.V., Malandrakis S.G., Skoulakis C.E. and Bizakis J.G. Oral mucosal melanoma : a malignant trap. Head Face Med. 28, 2-7.

229. Seetharamu N., Ott P.A. and Pavlick A.C. Mucosal melanomas: a case-based review of the literature. Oncologist 15, 772-781.

230. Janice M. Mehnert, Mary M. McCarthy, Lucia Jilaveanu, Keith T. Flaherty, Saadia Aziz, Robert L. Camp, David L. Rimm, and Harriet M. Kluger. Hum Pathol. 2010 March; 41(3): 375–384, Quantitative Expression of VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2 and VEGFR3 in Melanoma Tissue Microarrays.

231. Pratheeshkumar P, Kuttan G. Vernolide-A inhibits radiation-induced hypoxia-medisted tumor angiogenesis by regulating HIF-1α, MMP-2, MM-9 and VEGF. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2011, 30(2): 139-51.