



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

**IL RUOLO DELLA SEMAFORINA NEL
MELANOMA MALIGNO CUTANEO**

Relatore: Chiar.ma
Prof.ssa Annamaria Offidani

Tesi di Laurea di:
Alessandra Valeri

Correlatore: Chiar.ma
Prof. Oriana Simonetti

A.A. 2019/2020

A mio nonno Piero

RIASSUNTO

Lo spessore di Breslow e il livello di Clark sono tutt'ora importanti fattori da valutare per il melanoma cutaneo ma non sempre forniscono una prognosi precisa. È quindi necessario cercare ed individuare nuovi fattori che possano riuscire a dare una previsione più accurata del decorso tumorale. L'angiogenesi è essenziale per lo sviluppo e la progressione tumorale e questa viene regolato da due attori principali che sono il VEGF (fattore di crescita endoteliale vascolare) e le semaforine (SEMA), in modo particolare la semaforina 3A inibisce gli effetti angiogenici prodotti dal signaling VEGF mediato. Tuttavia il ruolo prognostico dei fattori angiogenici rimane incerto. Ad oggi non era disponibile nessuna informazione sull'espressione della semaforina SEMA3A nel contesto del melanoma cutaneo umano. In questo studio è stata indagata la densità microvascolare e i livelli di espressione immunoistochimici e dell'mRNA di VEGF e di SEMA3A in 60 melanomi cutanei sottili (con uno spessore di Breslow inferiore a 1 mm), in 60 melanomi cutanei con uno spessore intermedio (da 1.1mm a 4.0 mm) e in 50 melanomi cutanei a spessore elevato (maggiore di 4 mm) rapportandoli ai parametri clinici/patologici e alla sopravvivenza malattia-specifica. Non è stata identificata nessuna associazione tra livello di Clark, spessore di Breslow, presenza di metastasi e la sopravvivenza; il livello di Clark era scarsamente rapportato alla sopravvivenza. L'espressione del VEGF e la densità microvascolare erano significativamente maggiori nei melanomi a spessore intermedio e a spessore elevato ed erano correlati sia al livello di Clark e allo spessore di Breslow ma non alla presenza o meno di metastasi e non alla sopravvivenza. Al contrario invece l'espressione di SEMA3A era significativamente ridotta nei melanomi a spessore intermedio ed elevato ed era associata alla presenza di metastasi e alla scarsa sopravvivenza. Il rapporto VEGF/SEMA3A è risultato più elevato nei melanomi a prognosi peggiore risultando il fattore maggiormente correlato alla presenza di metastasi e alla valutazione della sopravvivenza. L'espressione di SEMA3A e il rapporto VEGF/SEMA3A quindi si sono rivelati preziosi marcatori prognostici di cui avvalersi nel paziente affetto da melanoma cutaneo in particolare in caso di spessore di Breslow maggiore di 1 mm. SEMA3A dunque potrebbe essere un candidato ideale come soppressore tumorale nella terapia del melanoma cutaneo

INDICE

Parte I:

- INTRODUZIONE..... p. 6
- EPIDEMIOLOGIA p. 7
- FATTORI DI RISCHIO p. 8
- ISTOPATOLOGIA p.11
- STORIA CLINICA..... p.15
- ASPETTI BIOMOLECOLARI p.17
- DIAGNOSI p.25
- STADIAZIONE p.41
- TRATTAMENTO p.46
- VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA AL TRATTAMENTO p.62
- FOLLOW-UP..... p.67

Parte II:

- LE SEMAFORINE p.70
- INTRODUZIONE ALLO STUDIO p.72
- MATERIALI E METODI..... p.73
- RISULTATI p.75
- DISCUSSIONE..... p.87
- CONCLUSIONE p.90

- BIBLIOGRAFIA p.91

PARTE I

Introduzione:

Il melanoma è un tumore maligno particolarmente aggressivo che ha origine dalla trasformazione neoplastica dei melanociti, cellule presenti soprattutto nello strato più profondo dell'epidermide. I melanociti derivano ontogeneticamente dalle cellule multipotenti della cresta neurale. I precursori dei melanociti, che prendono il nome di melanoblasti, migrano dalla cresta neurale e colonizzano svariati tessuti, tra cui la cute embrionale, tra il secondo e terzo mese di vita intrauterina (1). I melanociti, una volta giunti a livello epidermico stabiliscono per mezzo di prolungamenti dendritici dei rapporti morfofunzionali con un certo numero di cheratinociti variabile a seconda delle zone da 15-20 fino a 40 costituendo così le unità epidermo-melaniche. La funzione principale dei melanociti è la sintesi della melanina o per meglio dire di melanine cioè di pigmenti di diversa composizione chimica a cui è dovuta la differente colorazione della cute, dei capelli e dei peli, sintesi che è resa possibile dalla presenza dell'enzima tirosinasi, una cuproproteina di cui i melanociti sono particolarmente provvisti (2). La melanina viene raccolta dai melanosomi che si trasformano un poco alla volta in un granulo pigmentato. Nel momento in cui la sintesi cessa, i melanosomi vengono liberati attraversando i prolungamenti citoplasmatici e vengono trasferiti ai cheratinociti basali. Alla melanina è demandata in gran parte la difesa dai raggi UV in quanto ha la capacità di assorbire la radiazione ultravioletta che è in grado di causare danni diretti al DNA. Normalmente i melanociti sono di regola cellule singole ma a volte crescono a grappolo formando nidi di cellule benigne dette nevi che hanno l'aspetto di macchie di colore scuro fino al nerastro. Il melanoma può insorgere su cute (ex novo) o su un nevo melanocitico acquisito o congenito preesistente o in contiguità con esso (nel 22-57% dei casi). Si localizza prevalentemente a livello cutaneo, più comunemente sulle superfici fotoesposte ed, in particolare, a livello della parte superiore del dorso negli uomini e a livello delle gambe e del dorso nelle donne. In una ridotta percentuale di casi (15%) il melanoma può insorgere in sedi diverse dalla cute. La maggior parte dei melanomi non cutanei insorgono a livello oculare (melanomi congiuntivali o della coroide). Le altre sedi più comuni sono la vulva, ano e canale ano-rettale, vagina, la cavità orale, il naso-faringe, i seni paranasali, l'esofago. Melanomi primitivi degli organi profondi (bronchi, vescica, surrene, leptomeningi) sono estremamente rari (1).

EPIDEMIOLOGIA:

Il melanoma insorge nell'85% dei casi in sede cutanea e rappresenta il 5% dei tumori maligni della cute (3). A partire dagli anni Sessanta l'incidenza del melanoma è aumentata del 3-8% ogni anno nei soggetti di origine europea/caucasica con l'incremento maggiore nei maschi al di sopra dei 60 anni di età. Nel Nord Europa e negli USA il melanoma rappresenta il 2-3% di tutti i tumori maligni (4). Circa l'85% dei melanomi cutanei che insorgono annualmente nel mondo interessano le popolazioni di Nord-America, Europa e Oceania (3). La sua incidenza, oltre a variare sensibilmente tra le diverse aree del mondo, sembra essere associata strettamente al colore della pelle predominando nella razza caucasica, mentre rimane molto bassa negli africani e negli asiatici di pelle scura. I tassi d'incidenza più elevati in assoluto si riscontrano in Australia e Nuova Zelanda, con 40-60 casi su 100000 abitanti all'anno seguiti dai paesi del Nord Europa i più bassi invece in Giappone e nell'Africa Centrale (0,4/100000 abitanti) (4). Il melanoma ad oggi è considerato il quinto tumore più comune negli uomini e il sesto più comune nelle donne negli USA dove l'incidenza dal 1973 al 2002 è aumentata del 270%. Attualmente in America 1 persona su 63 incorrerà nel melanoma durante la sua vita. Si tratta di uno dei principali tumori che insorge in tenera età, in termini di incidenza rappresenta nella popolazione italiana rispettivamente il secondo e il terzo tumore più frequente nei maschi e nelle femmine al di sotto dei 50 anni. In Italia nel 2019 sono attesi quasi 12.300 nuovi casi di melanoma della cute, 6.700 tra gli uomini e 5.699 tra le donne (4% di tutti i tumori in entrambi i sessi) (3). Esiste tuttavia una notevole variabilità geografica nell'incidenza del melanoma cutaneo nel nostro paese con un evidente trend decrescente nord-sud: i tassi di incidenza sono fino a due volte più bassi nel Sud Italia rispetto a quelli nelle aree del Centro-Nord Italia. Parallelamente a questo aumento del tasso di incidenza vi è anche un aumento della mortalità correlata al melanoma, sebbene in misura inferiore (5). Negli Stati Uniti il tasso di mortalità è aumentato dell'1,4% ogni anno tra il 1977 e il 1990. Dal 1990 ha mostrato una leggera tendenza al ribasso ed è diminuito dello 0,3% all'anno dal 1990 al 2002. Dal 2003 al 2007 l'età media della morte per melanoma maligno era di 68 anni (6). Vi è un maggiore tasso di mortalità negli uomini (+ 2,3% dal 1975 al 1989 e + 0,2% dal 1989 al 2007) rispetto alle donne della stessa età negli Stati Uniti (+ 0,8% tra il 1975-1989 e nel periodo tra il 1989-2007 come sembra diminuire di -0,6%) (6). A differenza di altri tumori solidi, il melanoma colpisce soprattutto i giovani e le persone di mezza età. L'età mediana al momento della diagnosi del melanoma è di 57 anni ed è stato osservato che l'incidenza di questo tumore aumenta linearmente dopo i 25 anni fino a 50 anni e poi rallenta, specialmente nelle femmine.

Nell'ultimo quinquennio, dunque, in Italia i decessi attribuiti a melanoma cutaneo sono stati 4.000 nei maschi e oltre 3.000 nelle femmine, corrispondenti a tassi medi di mortalità rispettivamente di 5 e 6 su 100.000 abitanti l'anno. Però con punte di incidenza superiori a 10 per 100.000 abitanti in ambedue i sessi a Trieste e superiori al 6-7 per 100.000 a Genova, in Veneto ed in Romagna. Nelle Regioni italiane settentrionali la mortalità per melanoma cutaneo è per entrambi i sessi, circa il doppio di quella registrata nelle Regioni meridionali.(5)

Secondo il Registro Tumori Marche il cui ultimo aggiornamento risale al periodo 2010-2012 nei 3 anni di osservazione si sono registrati nella Regione Marche un'incidenza di 997 casi con una media di 332 casi/anno. Si è notato un eccesso significativo di incidenza nella Provincia di Ancona con ben 386 casi. Valori inferiori di incidenza si sono registrati nella provincia di Macerata con 162 casi e nella Provincia di Ascoli Piceno con 114 casi.

L'Incidenza dei melanomi della cute nel sesso maschile risulta essere 21,3/100.000 con valore inferiore al dato medio Centro/Italia 23,1 su 100.000 e superiore al dato medio Italia 18,0/100.000. Nel sesso femminile l'incidenza dei melanomi della cute risulta essere 18,9/100.000 valore superiore al dato medio Centro/Italia 18,2/100.000 (eccesso non significativo) e superiore al dato Italiano 14,7/100.000 (significativo Statisticamente).

La mortalità risulta di essere 143 casi una media di 47 casi/anno (6).

FATTORI DI RISCHIO:

I fattori di rischio che concorrono allo sviluppo del melanoma possono essere divisi in due categorie: da un lato abbiamo i fattori di rischio correlati alle caratteristiche individuali del paziente che vengono identificati con il nome di fattori di rischio endogeni, dall'altro lato abbiamo i fattori di rischio esogeni cioè correlati all'ambiente e allo stile di vita che viene intrapreso (1):

- 1- Caratteristiche fototipiche: il I e II fototipo sono sicuramente quelli a maggior rischio comprendendo individui con compresenza di occhi chiari, capelli rossi o biondi, tendenza a scottarsi facilmente, difficoltà ad abbronzarsi, presenza di lentiggini.
- 2- Numero di nevi: numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato che il numero di nevi è il più importante fattore di rischio indipendentemente da dimensione e distribuzione: il melanoma infatti solitamente insorge su un nevo melanocitico acquisito o congenito preesistente nel 22-57% dei casi, tale percentuale è maggiore in caso si stia parlando di un melanoma insorto in giovane età che nel 60% delle volte insorge su un preesistente nevo congenito gigante: è stato calcolato che in media 1/7000 nevi si trasforma in

melanoma (1), quindi più nevi sono presenti maggiore è la probabilità di insorgenza del tumore. Tucker e al.⁹ confrontando 700 pazienti con melanoma e 1000 individui sani hanno evidenziato che il rischio di melanoma era 2 volte maggiore in pazienti con un elevato numero di nevi piccoli non displasici (<5mm), 4 volte maggiore in pazienti con nevi sia piccoli sia maggiori di 5 mm mentre non era associato alla presenza di nevi congeniti. La presenza di un singolo nevo displasico risultava associata ad un rischio relativo 2 volte maggiore di sviluppare un melanoma che aumentava fino a 12 volte in presenza di 10 o più nevi(1).

- 3- Esposizione solare: Rappresenta il più importante fattore di rischio ambientale su cui è possibile intervenire attivamente svolgendo una prevenzione di tipo primario; L'esposizione più pericolosa ai raggi UV-A (320-400 nm) e in particolare ai raggi UV-B (290-320 nm) è quella di tipo occasionale ed intensa, specialmente in aree cutanee non abitualmente fotoesposte, ancora più pericolosa se perpetuata in giovane età e se porta allo sviluppo di ustioni solari, a differenza di quella continuativa e moderata che predispone solitamente ai basaliomi (4); Ulteriori esperimenti hanno dimostrato che le radiazioni UV portano spesso a mutazioni del DNA, come la formazione di dimeri di pirimidina o deaminazione della citosina in timidina. Il melanoma è un tumore ad alto tasso di mutazione di base che supera quello di quasi tutte le altre forme di tumore solido, che può essere facilmente attribuito alla potenza degli effetti mutageni UV. (1)

Oltre all'esposizione solare anche l'utilizzo smoderato di lettini abbronzanti e lampade estetiche si sono rivelati incidenti nell'aumentare la probabilità di insorgenza tumorale.

- 4- Familiarità: La frequenza del melanoma maligno familiare varia dal 5 al 10% dei casi, inoltre in soggetti con parenti di primo grado affetti da melanoma il rischio di incorrere nel tumore è del 4-5% (1); In queste famiglie che hanno questa alta frequenza di melanoma è spesso presente chiara ereditarietà e si ritrovano alterazioni a carico di geni importanti nella regolazione del ciclo cellulare. Il gene di suscettibilità ad alta penetranza più comunemente coinvolto è *CDKN2A*, responsabile della predisposizione in circa il 20% dei casi. Raramente è coinvolto *CDK4*, un altro gene ad alto rischio (4). Di recente sono state descritte mutazioni in *BAP1*, *POT1*, *TERF2IP*, *ACD* e *TERT*. Circa venti varianti genetiche comuni modulano il rischio di melanoma nelle famiglie con bassa ricorrenza. Tali alterazioni rendono il soggetto più sensibile ai danni indotti dall'esposizione solare, aumentando significativamente il

rischio di sviluppare melanomi. In alcune famiglie affette, la suscettibilità è coerente con una trasmissione autosomica dominante, ma nella maggior parte dei casi la trasmissione sembra essere poligenica. I pazienti devono essere informati del rischio raddoppiato di sviluppare la malattia in presenza di una storia familiare positiva per il melanoma in un consanguineo prossimo. Una storia positiva in più familiari e alcune caratteristiche fenotipiche personali rilevanti (come le lesioni melanocitiche multiple atipiche pigmentate) comportano un rischio significativamente più elevato. Esistono inoltre famiglie con aumentata incidenza di melanoma caratterizzate dalla sindrome del nevo displastico o atipico o FAMMM syndrome (Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrome): si tratta di una sindrome ereditaria a trasmissione autosomica dominante in cui sono presenti mutazioni germinali del gene *CDKN2A*, il quale codifica per le proteina p16 (INK4) e p14 (ARF) (8). Per identificare tale sindrome è necessaria la presenza di tutti e tre questi criteri diagnostici: 1-Diagnosi di melanoma in uno o più parenti di primo o secondo grado 2-Presenza di più di 50 nevi alcuni dei quali clinicamente atipici, 3- Nevi con determinate caratteristiche istologiche (8). Il melanoma che eventualmente si sviluppa nei soggetti affetti da tale sindrome è abitualmente un melanoma a diffusione superficiale con insorgenza in età più giovane inoltre la presenza di tale sindrome predispone allo sviluppo di melanomi multipli.

Meno incidenti ma pur sempre presenti come fattori di rischio abbiamo la presenza di xeroderma pigmentoso (genodermatosi a trasmissione autosomica recessiva, rara, da elevata sensibilità alle radiazioni ultraviolette (UV), associata ad alterazioni cutanee e oculari e a carcinomi cutanei multipli causata da una mutazione a livello 8 geni implicati nella riparazione del DNA.) l'età avanzata (in quanto circa la metà di tutti i melanomi si verificano in persone di età superiore a 50 anni) e lo stato di immunosoppressione (infatti alcune patologie e alcuni farmaci indeboliscono il sistema immunitario). Non vi sono invece abbastanza evidenze per attribuire una correlazione tra assunzione anche prolungata di anticoncezionali estroprogestinici e insorgenza di melanoma nonostante i numerosi studi attuati in questa direzione.(1)

Naturalmente possono essere attuati interventi sia di prevenzione primaria che di prevenzione secondaria; Per quanto riguarda la prevenzione primaria si possono attuare campagne di sensibilizzazione contro l'esposizione solare sregolata soprattutto rivolte agli adolescenti che, assieme ai bambini sono i più a rischio, quindi consigliare l'utilizzo di schermi solari in caso

di fotoesposizione, l'utilizzo di copricapi volti alla protezione del viso, evitare di esporsi al sole durante le ore centrali della giornata ed evitare l'incidenza di scottature, figlie di esposizioni acute(3). Eventuali interventi di prevenzione secondaria dovrebbero riguardare soggetti affetti da sindrome nevodisplastica, xeroderma pigmentosum, pazienti portatori di nevi congeniti e soggetti con storia familiare di melanoma, i quali dovrebbero essere inseriti in programmi di sorveglianza attiva per la diagnosi precoce di melanoma.

ISTOPATOLOGIA:

Nel melanoma possiamo riconoscere due fasi distinte di crescita: una crescita di tipo radiale e una crescita di tipo verticale; questo è un concetto fondamentale nella comprensione della progressione del tumore. La crescita di tipo radiale descrive la diffusione orizzontale del melanoma all'interno dell'epidermide e del derma superficiale. Durante questo stadio iniziale le cellule tumorali sembrano essere prive della capacità di metastatizzare e sembrano non essere presenti atipie cellulari marcate; dopo un periodo di tempo variabile e non prevedibile il melanoma passa dalla fase radiale alla fase di crescita verticale durante la quale le cellule tumorali invadono verso il basso negli strati dermici più profondi come una massa espansiva. La fase di crescita verticale è spesso preannunciata, dal punto di vista clinico dalla comparsa di un nodulo ed è correlata alla comparsa di un clone di cellule con potenziale metastatico (7). Diventano più evidenti e frequenti le atipie e le mitosi, le cellule acquisiscono un forte impulso proliferativo, occupano tutto lo spessore dell'epidermide e possono spingersi anche nel tessuto adiposo sottocutaneo. Nel corso della fase di crescita verticale ovviamente vi è un aumentato rischio di diffusione della malattia attraverso i vasi linfatici quindi parliamo di una diffusione locoregionale, linfonodiale e attraverso i vasi sanguigni presenti nel derma.

La classificazione in istotipi del melanoma cutaneo è databile al 1982 ed è stata stilata da un gruppo internazionale di patologi ed epidemiologi riunitisi a Sidney che l'hanno formulata basandosi sullo schema di Clark del 1969. I differenti istotipi sono identificati in base ai caratteri istologici dell'area periferica del melanoma adiacente alla componente invasiva che viene identificata come "spalla" della lesione. In un 10% dei casi la componente intraepidermica non è classificabile in nessuno degli istotipi codificati (MNAS melanoma non altrimenti specificato) (1).

Si possono identificare 4 istotipi principali:

- **Melanoma a diffusione superficiale:** è la forma più comune rappresentando il 70% di tutti i melanomi. L'età media in cui viene diagnosticata la lesione è 50-60 anni. Tende a comparire su cute fotoesposta, specialmente sul dorso (negli uomini) e sugli arti inferiori (donne) (4). Clinicamente parlando appare sotto forma di chiazza brunastra difficile da distinguere rispetto al resto della cute, con colori che vanno dal rosso spento al bruno-nerastro, con margini piuttosto marcati. Si possono notare piccole dentellature dei margini, insieme a un incremento delle dimensioni e a variazioni cromatiche. La lesione si estende a macchia d'olio mostrando spesso piccole aree biancastre di regressione che rendono il colore meno uniforme. Dopo mesi o anni, assume aspetto più o meno nodulare, ulcerandosi. Questo indica che il tumore è passato dalla diffusione orizzontale a quella verticale (1). All'istologia possono essere evidenziati melanociti atipici di tipo epitelioidi, dotati di ampio citoplasma e di nucleo pleomorfo vescicoloso. La presenza di singoli elementi nel contesto dell'epidermide giustifica il termine di invasione pagetoide mentre l'epidermide spesso è acantotica. Spesso è presente alla base della lesione un infiltrato dermico reattivo prevalentemente di tipo linfo-monocitario; in fasi più avanzate alla proliferazione radiale si associa una componente di invasione verticale (fase invasiva): in questa fase si osservano cellule dermiche aggregate in nidi con caratteristiche di coesività e dimensioni maggiori di quelli intraepidermici. Si possono notare anche la presenza di elementi mitotici diffusi e l'assenza della "maturazione" tipica dei nevociti. Questo tipo di melanoma è più comunemente caratterizzato da mutazioni attivanti sul gene *BRAF* V600 (9).
- **Lentigo Maligna-Melanoma:** Questa tipologia è poco frequente e rappresenta il 10% circa dei melanomi primitivi (1). Insorge soprattutto nelle persone anziane (preferenzialmente donne) e si localizza generalmente nelle aree cronicamente fotoesposte del volto e del collo dove assume solitamente l'aspetto di una macula o chiazza di forma irregolare, di dimensioni variabili dai 5 ai 15mm, asintomatica, piana, di colorito marrone o bruno, ricoperta da chiazze di colore marrone più scuro o nero, sparse irregolarmente sulla sua superficie; Si espande lentamente e, senza trattamento, raggiunge la dimensione di un grosso medaglione. Ha una chiara correlazione con l'esposizione solare e presenta un accrescimento generalmente lento, con fase iniziale di melanoma in situ (lentigo maligna di Dubreuilh) di lunga durata prima della progressione a melanoma invasivo. Istologicamente si evidenzia una proliferazione di melanociti atipici dendritici disposti lungo la giunzione dermoepidermica con interessamento degli strati più superficiali dell'epidermide, che

appare atrofica, e delle strutture annessiali. Un infiltrato infiammatorio linfocitario frammisto a melanofagi è fortemente rappresentato. Vi è costantemente elastosi attinica. (1) Questo tipo di melanoma presenta di frequente mutazioni nel gene *C-kit*.

- **Melanoma nodulare:** E' il secondo sottotipo di melanoma in ordine di frequenza (15-30%) e rappresenta la variante più aggressiva. Insorge principalmente nei maschi intorno ai 50-60 anni. Compare in qualunque parte del corpo in forma di papula esofitica, di colore scuro, oppure come una placca di colore variabile dal bianco perla al grigio, al nero. Occasionalmente, la lesione contiene piccole quantità di pigmento (se presente) oppure può avere un aspetto simile a un tumore vascolare (4). Non rappresenta la fase di evoluzione radiale mentre si presenta dall'inizio con crescita verticale rapida e spesso con metastasi alla diagnosi, spesso accompagnato da ulcerazione e sanguinamento. Istologicamente i melanociti che invadono il derma si organizzano in teche e/o aggregati confluenti.
- **Melanoma a tipo acrale lentiginoso:** Questo tipo rappresenta il 3-10% di tutti i melanomi. È il tipo più raro negli individui di razza caucasica mentre rappresenta il tipo più comune nella popolazione di razza africana. Colpisce per lo più la popolazione anziana e insorge preferenzialmente sulla cute palmo-plantare e subungueale, raramente sulle mucose(4). A livello subungueale si presenta inizialmente con una banda longitudinale ipercromica della lamina ungueale, di tonalità marrone scuro o bruno bluastra che gradualmente si estende coinvolgendo tutta l'unghia e le zone circostanti. Solitamente si presenta con un reperto istologico tipico, simile a quello del melanoma tipo lentigo maligna. I melanociti atipici presentano prolungamenti dendritici, con nucleo ipercromico e pleomorfo, si ritrovano in singole unità lungo la giunzione dermoepidermica e in occasionali nidi disordinatamente disposti all'apice delle papille dermiche. A volte presenta un *pattern* di crescita lentiginoso, in cui i melanociti sono organizzati in singole unità lungo lo strato basale dell'epidermide, senza un'evidente crescita pagetoide (1). Questo tipo di melanoma presenta spesso mutazioni nel gene *C-kit* (10).

I melanomi che insorgono a livello delle mucose (principalmente a livello della mucosa orale, anale, vaginale, nasale) invece presentano per lo più caratteri istopatologici simili al melanoma acrale lentiginoso, anche se in queste sedi possono comunque insorgere melanomi a diffusione superficiale e nodulari. Per quanto riguarda i melanomi della congiuntiva si riconoscono gli stessi istotipi cutanei e la loro prognosi è strettamente correlata allo spessore

della neoplasia. I melanomi della coroide invece hanno una prognosi che è legata all'eventuale estensione alla sclera e al nervo ottico, alle dimensioni, al tipo cellulare e all'indice mitotico. Infine tale neoplasia può insorgere dai melanociti dell'uvea circondando strutture intraoculari come iride, corpi ciliari e coroide (1).

Oltre alle 4 varianti sopra descritte ve ne sono altre che seppur di meno frequente riscontro presentano caratteri peculiari, tali da consentirne l'individuazione come entità clinico istologiche a se stanti:

- Melanoma desmoplastico: Variante a prognosi severa, nella quale sono presenti segni istologici simili a quelli di processi fibrosanti o di neoplasie dei tessuti molli, con cellule fusate, con nuclei bizzarri, isolate o in piccoli gruppi, immerse in fasci di collagene maturo: la presenza di tale collagene è dovuto al fatto che i melanociti neoplastici acquisiscono la capacità di sintetizzare e secernere collagene. Questa variante spesso recidiva localmente per la difficoltà di un'adeguata asportazione chirurgica (1).
- Melanoma su nevo blu
- Melanoma su nevo congenito gigante: insorge spesso in neonati o bambini di età inferiore ai 5 anni. La componente maligna può avere caratteristiche istologiche assai differenti dai consueti melanomi, potendo presentare aspetti a piccole cellule poco differenziate, oppure presentandosi con cellule fusate con differenziazione neuroide o ancora con cellule mesenchimali eterologhe (1). Queste componenti possono essere tutte presenti contemporaneamente nella stessa lesione.
- Melanoma a deviazione minima: si colloca in posizione intermedia tra i nevi e i melanomi in quanto le cellule che lo caratterizzano non hanno le caratteristiche di cellule nevice benigne ma nemmeno atipie citologiche proprie dei melanomi (1). Ha ovviamente una prognosi migliore rispetto alle altre forme e viene anche detto "melanoma borderline" proprio per questa sua caratteristica di non essere propriamente maligno.
- Melanoma polipoide: si presenta come una lesione nodulare pedunculata spesso ulcerata. La prognosi è spesso sfavorevole per l'elevato spessore.
- Melanoma a cellule globose: oltre ai melanociti atipici di aspetto epitelioidale sono presenti aggregati e nidi di cellule globose di solito con scarsi aspetti di atipia.
- Melanoma mixoide: Può essere facilmente confusa con altre neoplasie ad aspetto mixoide, ad esempio con l'istiocitoma fibroso maligno, con lo schwannoma e il

condrosarcoma mixoide extrascheletrico. Proprio per questa tendenza a confonderlo è importante riconoscere questa forma per attuare un trattamento adeguato alla tipologia di neoplasia (1).

STORIA CLINICA:

Nel 50% dei casi la prima manifestazione del tumore è data dalla presenza di una manifestazione cutanea che può essere esordita da poco e quindi essere definita come “ex novo” oppure da trasformazione di una lesione cutanea già presente da tempo. Frequentemente si associa alla manifestazione cutanea un prurito anche piuttosto persistente, che può essere accompagnato da sanguinamento, ulcerazione e da fuoriuscita di secrezione sierosa. Questi ultimi tre sintomi sono assai più rari ma correlano direttamente con la malignità del tumore. Il decorso naturale del melanoma è definito dalla sua diffusione metastatica, il 15-35% dei pazienti senza metastasi al momento della prima diagnosi successivamente sviluppano una progressione della malattia. La metastasi da melanoma cutaneo può svilupparsi attraverso tre principali percorsi metastatici e quindi si può presentare come metastasi satellitare o in transit, come metastasi linfonodali regionali (per via linfatica) o come metastasi a distanza al momento della ricorrenza primaria (per via ematica) (1). Circa il 50% di tutti i pazienti con melanoma metastatico esordisce sviluppando metastasi linfonodali regionali con linfonodi che aumentano di dimensione e diventano clinicamente palpabili. La metastatizzazione per via linfatica può svolgersi attraverso due diverse modalità: “in transit” e peri-nervosa. La modalità “in transit” è causata dall’invasione delle vie linfatiche superficiali, da parte di cellule tumorali, a livello di derma e/o ipoderma; viene così chiamata in quanto si ha proliferazione di noduli neoplastici cutanei e sottocutanei lungo il decorso dei vasi linfatici del derma posti in prossimità della lesione primitiva o della cicatrice escissionale o nel segmento cutaneo posto tra la lesione e il linfonodo. La forma di metastatizzazione peri-nervosa è detta in questo modo in quanto le cellule neoplastiche diffondono attraverso i vasi linfatici che decorrono nelle adiacenze dei nervi o all’interno delle guaine nervose. Nell’altro 50% le prime metastasi sono metastasi satellitari (circa il 20%) o metastasi immediatamente distanti (circa il 30%) (1). Lo sviluppo di metastasi a distanza per via ematogena sembra essere un evento precoce nella diffusione metastatica e può nella maggior parte dei casi originare dal tumore primario, solo pochi casi possono svilupparsi secondariamente a metastasi locoregionali. In una percentuale variabile dei casi che va dall’1 al 12% viene fatta diagnosi sulla base della presenza di metastasi linfonodali e/o solide in assenza di evidenza clinica di melanoma sia cutaneo che delle mucose. Questo può

essere spiegato immaginando la presenza precedente di un melanoma cutaneo che poi successivamente è andato incontro a regressione spontanea. Vi è anche una correlazione tra sede del tumore e localizzazione metastatica: melanomi localizzati a livello di testa/collo e dorso portano preferenzialmente a metastasi per via ematogena quindi metastasi ad organi come fegato, polmone, cervello; al contrario pazienti con melanoma localizzato a livello di gamba/coscia come prima sede di metastasi nell'82% dei casi esordiscono con metastasi regionali linfonodali (1). La tendenza del tumore a metastatizzare si è visto essere correlata all'espressione di determinate molecole come ad esempio ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) molecola di superficie cellulare che favorisce l'adesione tra cellule o alla matrice extracellulare. L'espressione di questa molecola da parte delle cellule di origine melanocitica è direttamente correlato con l'avanzamento del processo di trasformazione maligna ed è stata osservata una significativa associazione tra l'espressione dell'ICAM-1 nelle lesioni primarie e lo spessore della lesione, nonché con una riduzione della sopravvivenza libera da malattia (11). L'espressione di tale molecola si è visto essere indotta da citochine infiammatorie quali IFN- γ , IL-1 e TNF- α (1). Se però da un lato l'espressione di tale molecola facilita la comparsa di metastasi dall'altro è implicata anche nella formazione della sinapsi immunologica necessaria per l'eliminazione mediata dalle cellule T. Tale modello di espressione dell'ICAM-1 nel melanoma è stato studiato per l'ultima volta nel 1997 in linee cellulari poco rappresentative. Ulteriori studi svolti recentemente (2017), effettuati usufruendo delle nuove tecniche molecolari come la PCR, infatti non sono riusciti a dimostrare una netta differenza di espressione dei livelli di mRNA dell'ICAM-1 tra melanociti primari e colture primarie di melanoma metastatico. Tuttavia, la colorazione immunoistochimica ha dimostrato una drammatica up-regolazione di ICAM-1 in particolare nella transizione da tumore primario a metastasi linfonodali. Questo nuovo studio indica che l'upregolazione di ICAM-1 è necessaria per iniziare la diffusione linfatica del melanoma ma nessun ulteriore aumento è associato con la progressione verso uno stadio IV di malattia (12). Una seconda molecola che è stata indagata in quanto probabilmente correlata alla tendenza a metastatizzare e ad una cattiva prognosi è la tirosinasi, precisamente l'RNA messaggero della tirosinasi la quale è specificatamente prodotta da cellule di derivazione melanocitaria. Una rilevazione tramite tecniche di biologia molecolare dell'RNA messaggero della tirosinasi nel sangue periferico infatti sembrava poter essere connessa alla presenza di cellule tumorali in circolo (13). Secondo uno studio del 2006 il rilevamento di cellule circolanti di melanoma che esprimono l'mRNA tirosinasi può essere particolarmente rilevante nei pazienti in stadio III, in cui la positività alla RT-PCR definisce una sottopopolazione ad alto rischio di recidiva, ma non

particolarmente rilevante ad indicare la probabilità di reperire metastasi, sia linfonodali che solide.

Secondo “I numeri del cancro in Italia 2019” la sopravvivenza a 5 anni per melanoma in Italia è pari all’87%. Esiste un forte gradiente per età in quanto la sopravvivenza a 5 anni passa dal 94% registrata nei pazienti giovani (15-44 anni) al 73% dei pazienti anziani (75+). La probabilità di sopravvivere a 5 anni dalla diagnosi è pari all’89,6% negli uomini e al 91,4% nelle donne, mentre la probabilità di sopravvivere essendo sopravvissuti al 5° anno dalla diagnosi sale al 99% e al 97,7% rispettivamente per gli uomini e le donne(5). Diversamente, invece, per quanto riguarda la malattia metastatica disseminata la sopravvivenza mediana è di 7-8 mesi, strettamente correlata al numero di metastasi presenti e alla presenza di valori di LDH particolarmente elevati, che assieme alla presenza di un basso performance status rappresentano dei fattori prognostici sfavorevoli. La sopravvivenza peggiore (3 mesi) è stata riscontrata in modo particolare nei pazienti affetti da metastasi cerebrali rispetto a pazienti con metastasi epatiche o polmonari (1).

ASPETTI BIOMOLECOLARI:

L’introduzione in ambito di biologia molecolare di tecniche sempre più pertinenti e moderne, come ad esempio la real-time PCR, ha portato all’individuazione di specifici pathways molecolari che vengono particolarmente over espressi in varie linee tumorali. In particolar modo per quanto concerne il melanoma sono 2 i pattern coinvolti e di cui valutare l’espressione: la via di trasduzione RAS/RAF/MEK/ERK, altrimenti detta via delle MAP chinasi e la via di trasduzione PI3K/AKT/mTOR. L’aberrazione a livello di queste due vie porta alla promozione della crescita e della sopravvivenza cellulare. La più recente classificazione genomica del melanoma deriva dal lavoro del “The Cancer Genome Atlas Network” che ha classificato il melanoma cutaneo in 4 sottotipi basandosi sui geni più frequentemente mutati: 1. BRAF; 2. RAS; 3. NF1; 4. Triple-WT (assenza di mutazioni dei geni BRAF, RAS e NF1; mutazioni e amplificazioni di c-KIT rappresentano una delle caratteristiche di quest’ultimo sottotipo) . Non si sono riscontrate associazioni tra sottotipo molecolare e prognosi, mentre i casi che manifestavano un profilo di attivazione immunologica, indipendentemente dal genoma, erano associati a migliore sopravvivenza, suggerendo l’importante ruolo prognostico dell’immuno-biologia del microambiente tumorale e offrendo spunti per nuove strategie per la personalizzazione delle terapie (14). Numerosi studi effettuati da Curtis et al. hanno determinato il vasto scenario mutazionale del melanoma in particolare in relazione all’esposizione ai raggi UV e al danno cronico solare. Andando ad

analizzare i melanomi acrali, mucosi e la loro associazione con la cute cronicamente esposta al sole e non (CSD e non-CSD) hanno accertato che la maggior parte dei melanomi non CSD mostrava mutazioni a livello di BRAF o NRAS mentre gran parte dei melanomi CSD erano BRAF wild type (WT). I melanomi CSD hanno solitamente un alto carico mutazionale con NF1 e NRAS mutati al contrario i melanomi non CSD hanno un carico mutazionale intermedio e le mutazioni di più frequente riscontro sono quelle di BRAF V600E (50%) o di NRAS (15–20%) (15). Le mutazioni di BRAF sono primariamente riscontrate nei pazienti più giovani con tumori in aree non costantemente esposte al sole. Allo stesso tempo le mutazioni di BRAF sono meno comuni nei pazienti anziani e nei tumori insorti nelle aree meno cronicamente esposte al sole.

VIA DELLE MAP KINASI:

Fino al 90% dei melanomi mostra un'attivazione aberrante della via delle Map chinasi; Questo è un punto focale nello sviluppo di neoplasia in generale in quanto è responsabile della disregolazione del ciclo cellulare e dell'inibizione dell'apoptosi. Questa via di signaling ha il suo incipit ogni volta che un ligando extracellulare (come EGF, TGF α , PDGF) interagisce con un recettore ad attività tirosin-chinasica (14). Questa interazione induce una dimerizzazione del recettore con conseguente fosforilazione delle tirosine e attivazione della tirosin chinasi recettoriale. La chinasi attivata fosforila a sua volta ulteriori molecole effettrici che con un meccanismo a cascata mediano gli effetti dell'attivazione recettoriale inducendo la trascrizione e la sintesi di fattori di trascrizione come FOS e JUN. L'attivazione delle molecole effettrici può essere diretta o mediata da proteine adattatrici tra le quali annoveriamo GRB-2 che lega il fattore di scambio GTP/GDP detto SOS. SOS a sua volta agisce sulla proteina RAS che lega il GTP catalizzando la formazione di RAS-GTP che in questo modo può legare RAF, innescandone l'omodimerizzazione ed attivazione del dominio serin/treonin-chinasico. RAF quindi determina la fosforilazione e l'attivazione della MAP chinasi MEK, la quale va ad attivare la MAP chinasi ERK. I fattori di trascrizione attivati inducono la sintesi di fattori di crescita, dei loro recettori e di proteine che controllano l'ingresso nel ciclo cellulare (16). Le mutazioni principali di tale via che innescano poi il meccanismo di proliferazione incontrollata interessano le molecole BRAF, NRAS, C-KIT e GNAQ e tali mutazioni sono ritenute mutualmente esclusive.

- **BRAF**: La mutazione sicuramente più frequente e conosciuta è quella che coinvolge la molecola BRAF, infatti secondo alcuni dati il 60% delle neoplasie causate dall'esposizione solare intermittente presentano questa mutazione. La mutazione che

interessa questa molecola è una mutazione di tipo missenso in cui vi è un'alterazione in una tripletta e l'inserimento nella proteina di un aminoacido diverso da quello originale. Circa nell'80-90% dei casi la mutazione che colpisce BRAF porta alla sostituzione della valina con acido glutammico (V600E), in misura minore possiamo trovare la sostituzione della valina con la lisina (mutazione V600K) (5-12% dei casi), con arginina (V600R) o con l'acido aspartico V600D (<5%). La proteina BRAF, il cui gene è localizzato sul cromosoma 7, è una serin/treonin protein kinasi formata da 766 aminoacidi e organizzata in 3 domini di cui uno è il dominio catalitico responsabile della fosforilazione di MEK la quale, a sua volta, fosforila e attiva ERK, che costituisce l'effettore finale della cascata MAPK. Nella mutazione maggiormente rappresentata, la V600E, la valina, aminoacido idrofobico, viene sostituita dall'acido glutammico il quale invece è un aminoacido idrofilo e questo comporta una modificazione strutturale del dominio catalitico che implica un'attivazione costitutiva della chinasi (17). Si è visto che le cellule che esprimono questa mutazione hanno un'elevata attività di fosforilazione delle kinasi (ERK1/2) e a seguito di questo vi è un'elevata produzione di fattori di crescita e chemochine. Tra queste annoveriamo la presenza dell'interleuchina 8 (IL-8), una chemochina pro infiammatoria e un potente fattore autocrino il quale promuove la crescita tumorale e l'angiogenesi, evidenze scientifiche hanno anche dimostrato che è la presenza di questa interleuchina a promuovere lo sviluppo di metastasi, in quanto favorisce l'adesione dei melanociti all'endotelio vascolare e la loro diffusione al di fuori dei vasi attraverso lo stesso endotelio (18). A conferma dell'attività di rilievo svolta da questa chemochina uno studio ha rivelato che il trattamento con vemurafenib (inibitore di Braf) determina una riduzione in circolo e dell'espressione dell'mRNA sia dell'IL8 che del CTGF entrambi notevolmente aumentati in presenza di neoplasia (19). Nonostante sembri evidente il coinvolgimento di BRAF mutato nella carcinogenesi come evidenziato dallo studio di Pollock et al., 2003 la mutazione V600E è presente in circa l'80% dei nevi benigni quindi la presenza dell'alterazione di BRAF è condizione non sufficiente a indurre lo sviluppo tumorale e quindi necessita di ulteriori mutazioni o alterazioni epigenetiche per portare allo sviluppo tumorale (20). Tra le alterazioni epigenetiche che si possono riscontrare annoveriamo la presenza di metilazione aberrante del DNA a livello della citosina (5mC), modificazioni degli istoni, l'espressione di ncRNA e rimodellamento della cromatina. Tra le modificazioni epigenetiche di maggior rilievo implicate nel melanomagenesi vi è l'ipermetilazione del promotore del gene CDKN2A localizzato a

livello del cromosoma 9 e che codifica per 2 oncosoppressori: P16 (INK4A) e p14(ARF). Quest'ultimo determina una riduzione della proliferazione cellulare attraverso la stabilizzazione della p53 mentre p16 o anche conosciuta come INK4A. Questa proteina si occupa di inibire l'azione delle chinasi dipendenti da ciclina (CDK) in particolare CDK4 e CKD6, e quindi è in grado di bloccare il ciclo cellulare ed impedire la mitosi (21). L'ipermetilazione di questo gene è presente nel 10–20% dei melanomi in fase verticale ed è associato con l'aumento dell'espressione di Ki67 e la riduzione della sopravvivenza. Un'altra modificazione epigenetica che può concorrere allo sviluppo tumorale è l'inattivazione per ipermetilazione del promotore del gene della MGMT (O₆ metilguanina DNA metiltransferasi), così come la presenza in circolo di determinati mirna i quali possono agire sia da oncosoppressori che da protooncogeni. Tra questi particolare rilievo lo ha miR-31, spesso deletato in presenza del melanoma, che agisce solitamente come oncosoppressore regolando negativamente l'espressione dell'oncogene EZH2 (22).

- **N-RAS:** La proteina codificata dal gene N-Ras fa parte degli oncogeni della famiglia di Ras assieme ad altre due come H-Ras e K-Ras. Le proteine sintetizzate da questi tre geni sono delle GTPasi che intervengono convertendo GTP in GDP. Ras è una proteina G monomerica che prende parte della catena di trasduzione del segnale attivata dalla interazione tra ligando e recettore tirosinchinasico. Tale recettore viene attivato solo se vi è una simultanea fosforilazione con un altro recettore posto in vicinanza attraverso un meccanismo che viene identificato con il nome di transfosforilazione. Conseguentemente a ciò il recettore si lega prima a Grb2 che a sua volta si lega alla proteina adattatrice SOS che viene in questo modo attivata. A questo punto Ras si lega a SOS ed effettua uno switch sostituendo GDP con GTP attivandosi; una volta attivato Ras prosegue la sua cascata interagendo con una chinasi chiamata c-Raf che interviene anch'essa nel processo di trasduzione (16). La mutazione di N-Ras è al secondo posto tra le mutazioni più frequentemente riscontrate nel melanoma in quanto viene rilevata in circa il 15-20% delle neoplasie; Generalmente la mutazione è mutualmente esclusiva a quella di Braf, mentre la coesistenza di entrambe le mutazioni ha una frequenza attorno al 1% (23). Le mutazioni di N-Ras solitamente si localizzano a livello dell'esone 2 (codone 12 e 13) e dell'esone 3 (codone 61); l'80% delle mutazioni di NRAS generalmente avvengono proprio a livello di quest'ultimo codone e tipicamente consistono in una mutazione missenso con sostituzione della glutammina con un altro aminoacido come l'arginina (38%), lisina (34%) o leucina

(10%). Le mutazioni che interessano invece l'esone 2 (codone 12 e 13) rappresentano il 20% di tutte le mutazioni riguardanti NRAS e solitamente sono localizzate nella regione loop del dominio G e solitamente consiste anche in questo caso in una sostituzione amminoacidica tra la glicina e l'acido aspartico (24). Entrambe le mutazioni conducono ad una attivazione costitutiva e persistente di RAS che porta ad una trasformazione maligna cellulare tramite un continuo stimolo di crescita cellulare, di sopravvivenza e antiapoptotico mediato dal pathways di cui fa parte ovvero quello delle Map Kinas. A differenza della mutazione di Braf che si verifica solitamente nei melanomi insorti su cute non esposta al sole, le mutazione di N-Ras incorrono indifferentemente sia in melanomi insorti su cute esposta che non anche se alcuni studi hanno evidenziato una prevalenza di mutazione dei melanomi insorti sui siti acrali. Tipicamente il paziente in cui si riscontra la mutazione di N-ras è solitamente un paziente adulto (età maggiore di 55 anni) con una storia di esposizione solare cronica, il cui tumore si presenta già inizialmente con uno spessore di Breslow elevato e alto livello di Clark quindi già subito in fase verticale e con un maggiore tasso mitotico rispetto ai melanomi BRAF mutati (25); a dispetto di ciò però sono tumori che tendono meno all'ulcerazione e con un grado di infiltrazione tumorale linfocitaria (TIL) minore (26). A differenza di quanto detto per la mutazione di Braf che può essere riscontrata anche nei nevi melanocitari benigni, la mutazione di N-Ras è invece assente e la sua presenza è associata a un aumento del rischio di metastasi del sistema nervoso centrale e viscerale rispetto ai tumori NRAS WT (27).

- **C-KIT**: C-Kit o anche denominato CD117 è un recettore transmembrana tirosin chinasi del terzo gruppo che è stato scoperto nel 1987 come omologo cellulare dell'oncogene virale v-kit. È espresso da innumerevoli linee cellulari come ad esempio le cellule emopoietiche, le cellule di Cajal, i mastociti e ovviamente le cellule melanocitarie. Questo recettore riconosce come suo ligando il fattore delle cellule staminali (SCF), forma un dimero con esso che attiva la sua intrinseca attività tirosinchinasica, che a sua volta fosforila e attiva le molecole di trasduzione del segnale che propagano il segnale. tra cui la via RAS-RAF-MEK-ERK e la cascata di PI3K-AKT, importanti per la proliferazione, differenziazione, sopravvivenza e migrazione cellulare (28). Un'attivazione costitutiva di questo recettore, conseguente alla presenza di mutazioni può provocare proliferazione cellulare, crescita incontrollata e angiogenesi in vari tipi di cancro tra cui i GIST, leucemia mieloide acuta e melanoma. Focalizzandoci su quest'ultimo, in circa il 3% dei melanomi viene

rilevata la presenza di mutazione di c-kit e più nello specifico nel 36% dei melanomi acrali, nel 39% dei melanomi mucosali e nel 28% di melanomi insorti su cute cronicamente esposta (29). Tale mutazione, a differenza di quella di BRAF, non è stata evidenziata in melanomi su cute non esposta. Le mutazioni di C-Kit sono per la maggior parte mutazioni puntiformi con sostituzione amminoacidica; circa il 70% delle mutazioni sono localizzate a livello dell'esone 11 (solitamente vi è una sostituzione tra lisina e prolina sul codone 576 che coinvolge il dominio iuxta-membranario), dell'esone 13 (sostituzione tra metionina e acido glutammico sul codone 642 che invece riguarda il dominio chinasi) (30). Entrambe queste mutazioni portano all'attivazione costitutiva di c-kit e all'induzione dei pathways cellulari MAPK e PI3K/AKT. Le mutazioni di c-KIT si verificano prevalentemente in melanomi della mucosa e acrale, solitamente si ritrovano in pazienti adulti/anziani ma non si è trovata nessuna connessione tra la presenza della mutazione e il sottotipo istologico. Tali melanomi, inoltre, sono caratterizzati da una prognosi peggiore se confrontati con quelli C-KIT wild type, con una minor sopravvivenza globale, in particolare per quelli mucosali (31). La prognosi negativa dei melanomi mucosali può essere in parte attribuibile alla diagnosi tardiva del tumore primitivo e/o alla difficoltà dell'escissione radicale a causa della loro peculiare localizzazione (32).

- **NF1**: Il gene NF1 è localizzato sul cromosoma 17 e codifica per una proteina chiamata neurofibromina. Questa proteina regola negativamente le componenti della famiglia di RAS andando ad interagire con l'attività delle GTPasi. Causa, se colpita da mutazione germinale, la neurofibromatosi di tipo I, una sindrome caratterizzata dalla presenza di alterazioni a livello cutaneo, oculare e nervoso causata dalla disregolazione del pathway RAS/MAPK. Gran parte delle mutazioni che colpiscono NF1 sono mutazioni con perdita di funzione, tra queste si possono trovare mutazioni missenso, non senso, delezioni, inserzioni e traslocazioni. Inizialmente, prima del sequenziamento genico, si era visto che vi era una frequente associazione tra la perdita di eterozigosi del gene mutato e il melanoma desmoplastico (33). Questa è una variante di melanoma con distinte caratteristiche cliniche istopatologiche e immunoistochimiche. Ad esempio clinicamente parlando questo differisce per l'elevata propensione alla ricorrenza locale e per una minore tendenza a metastatizzare ai linfonodi regionali. Solitamente tende a localizzarsi nelle regioni superiori del corpo quindi testa e collo e lo si riscontra con maggior facilità in pazienti anziani. Istologicamente presenta una ricca matrice di collagene con pochi melanociti

fusiformi. Mutazioni di *NF1* sono state trovate nel 93% dei casi di melanoma desmoplastico, suggerendo l'importanza di questo gene nella patogenesi di tale neoplasia. Studi più recenti, a seguito del sequenziamento dell'intero genoma hanno stabilito che NF1 è uno di quei geni che vengono definiti “key drivers” del melanoma, questo mostra un'elevata frequenza di mutazioni esoniche non silenti con una percentuale che oscilla tra i 12 e 18% di tutti i melanomi (34). Clinicamente parlando le mutazioni di NF1 sono più comuni nei melanoma che insorgono su cute cronicamente esposta al sole e/o in pazienti anziani. Solitamente sono melanomi con un elevato carico mutazionale quindi che presentano già mutazioni ai geni più famosi come BRAF e NRAS anche se nuovi studi hanno evidenziato che si può ritrovar anche in pazienti con melanoma wild-type per BRAF e NRAS. NF1 risulta mutato nel 15% dei casi circa e nella maggior parte dei casi, è interessato da mutazioni “loss of function” (33).

- **GNAQ/GNA11:** GNAQ e GNA11 sono i geni codificanti per 2 subunità α della proteina G eterotrimerica, che accoppiano i sette recettori del dominio transmembrana a vie di segnalazione intracellulari. Le mutazioni di *GNAQ* e *GNA11* nelle lesioni melanocitarie sono somatiche e mutualmente esclusive; solitamente si riscontrano in due hotspot: glutammina 209 e arginina 183, tali mutazioni portano ad un'attivazione costitutiva delle proteine G (35). Tali mutazioni si riscontrano per una percentuale attorno al 50%–85% nei melanomi non epiteliali, come specialmente i melanomi uveali e melanomi mucosali. GNAQ e GNA11 sono importanti per lo sviluppo e la progressione del melanoma uveale e sono associati all'attivazione della via delle MAPK che è lo stesso pathway che viene attivato in modo sregolato dalla mutazione dell'oncogene BRAF nei melanomi cutanei (36). Circa l'80% dei melanoma uveali hanno una mutazione di GNAQ or GNA11. Data la loro presenza nei nevi uveali, si ipotizza che le mutazioni di *GNAQ* e *GNA11* siano degli eventi precoci nella melanomagenesi uveale (36).
- **MITF:** MITF (microphthalmia-associated transcription factor) è un gene localizzato sul cromosoma 3 e codifica per un fattore di trascrizione bHLHzip (basic-helix-loop-helix-leucine-zipper) che regola lo sviluppo e la sopravvivenza dei melanociti e dell'epitelio pigmentato retinico e agisce inoltre nella trascrizione di geni codificanti per enzimi che intervengono nel processo di pigmentazione quali la tirosinasi, TRP1 e TRP2. Mediante l'attivazione di un centinaio di geni MITF può regolare vari processi biologici nelle cellule melanocitarie come la differenziazione, proliferazione cellulare,

migrazione, in aggiunta regola il metabolismo ossidativo della cellula e permette ai melanociti di adattarsi alle condizioni locali di nutrimento (37). Oltre a questo esercita un ruolo pro-sopravvivenza attivando l'espressione di geni anti-apoptotici come BCL2A1, BCL2 e BIRC7. Dallo splicing alternativo dello stesso gene derivano molteplici isoforme di MITF: MITF-A, MITF-B, MITF-C, MITF-D MITF-E MITF-H, MITF-J MITF-Mc e MITF-M. L'espressione dell'isoforma più breve MITF-M (una proteina di 419 residui amminoacidici) è limitata ai melanociti e alle cellule del melanoma. Le alterazioni di MITF possono essere le più varie e possono operare in diversi modi per determinare il destino tumorale delle cellule melanocitiche; ad esempio sostituzioni di una singola base nelle regioni non codificanti oppure recenti studi hanno individuato una variante oncogenica di MITF rinominata E318K la quale determina un guadagno di funzione del gene sia in pazienti che presentano melanoma familiare ma anche in una piccola porzione di pazienti con melanoma sporadico, E318K è stato identificato come un gene a media penetranza associato allo sviluppo di multipli melanomi primari e che rincorre frequentemente anche in pazienti che svilupperanno il carcinoma renale (37). Lo splicing alternativo è un altro meccanismo con cui viene modificato MITF nella patogenesi del melanoma: vi sono due varianti MITF(+) e MITF(-), queste due varianti assolvono funzioni diverse tra cui quella anti proliferativa di MITF(+).questo effetto è intimamente correlato all'interazione tra il frammento aggiuntivo N-terminale di MITF(+) con uno specifico esapeptide. L'attivazione del pathway MEK1-ERK2, indipendentemente dallo stato mutazionale di BRAF e NRAS, è stato individuato come un meccanismo che necessita l'espressione di determinate varianti di MITF (38) . Il meccanismo però più frequente con cui il gene MITF interviene nello sviluppo tumorale è l'amplificazione dell'espressione del gene che si riscontra in una percentuale di melanomi che va dal 5 al 20%. L'espressione di MITF nel melanoma è eterogenea e studi recenti hanno sottolineato il peso della sua espressione rapportato alla risposta del melanoma alle terapie target che hanno come bersaglio la via delle MAPK. Infatti l'amplificazione di MITF è stata anche trovata in pazienti trattati con gli inibitori di BRAF/MEK a conferma del fatto che quando la via delle MAPK viene inibita questa fornisce un vantaggio proliferativo o di sopravvivenza (37).

Diagnosi:

La diagnosi precoce in caso di melanoma, come ormai per tutte le neoplasie, è diventata l'obiettivo principale del clinico in quanto riesce a ridurre la morbidità e la mortalità correlata al tumore e alle terapie messe in atto per aggredirlo. Fondamentale è anche individuare il melanoma in fase iniziale prima che questo sia stato in grado di generare metastasi in quanto in caso di malattia disseminata il paziente dovrà essere sottoposto a trattamenti più invasivi i quali spesso e volentieri causano effetti collaterali importanti che richiedono cure e ospedalizzazioni come linfedema, decadimento cognitivo ed endocrinopatie. Come facile immaginare coloro che ricevono una diagnosi tardiva spesso hanno una riduzione della qualità della vita e di aspettativa di vita rispetto a quelli che ottengono una diagnosi precoce. Anche dal punto di vista economico il trattamento di un melanoma in fase precoce è certamente meno dispendioso del trattamento del melanoma metastatico il quale richiede l'immunoterapia la quale ha un costo che va dai 169320\$ per un trattamento completo con nivolumab ai \$228352 per la terapia combinata con nivolumab e ipilimumab. Quindi è facile dedurre come la diagnosi precoce sia auspicabile e necessaria (39).

Diagnosi clinica:

Clinicamente parlando il melanoma in fase precoce non dà segni di sé, alcuni sintomi che i pazienti possono riscontrare anche se abbastanza raramente sono la presenza di prurito e dolore che si associano alla presenza di un nevo che è insorto da poco o che ha subito modificazioni nell'arco del tempo. A seguito della metastatizzazione possono comparire sintomi correlati alla sede del secondarismo come dolori ossei, dispnea, senso di pesantezza all'ipocondrio destro, perdita di peso e astenia. Ulteriori segni che possono insospettire e indirizzare verso diagnosi di melanoma sono l'ulcerazione e la presenza di eritema a livello della lesione (1). In quanto solitamente ben visibile sulla superficie cutanea il melanoma si presta bene all'utilizzo di approcci non invasivi come primo metodo diagnostico ma anche all'auto-osservazione da parte del paziente che può identificare precocemente cambiamenti di forma, colore o dimensione insorti in breve tempo. Purtroppo solo il 10-25% degli adulti negli USA effettuano con regolarità un'autoispezione, sebbene si cerchi sempre di informare attraverso campagne di sensibilizzazione. Sarebbe d'uopo coinvolgere e formare determinate categorie lavorative le quali spesso e volentieri si ritrovano a valutare determinate zone molto più frequentemente rispetto al dermatologo o al medico di famiglia, in particolare parliamo

dei fisioterapisti, massaggiatori, parrucchieri e estetiste che quotidianamente ispezionano determinate aree del corpo e che potrebbero quindi contribuire all'aumento delle diagnosi precoci (39). La diagnosi quindi si avvale di diverse metodiche sempre più raffinate e precise partendo da una metodica semplice e non invasiva come l'ispezione "naked eye" quindi ad occhio nudo per poi via via passare all'utilizzo di strumenti diagnostici e analisi molecolari integrando i quali si riesce ad avere un quadro completo delle caratteristiche tumorali, fondamentale per poter instaurare una terapia efficace.

Fondamentale è effettuare prima dell'ispezione una meticolosa anamnesi, focalizzandosi sulla storia familiare del paziente quindi l'eventuale presenza in famiglia, soprattutto nei parenti di primo grado, di diagnosi di melanoma ma anche di altre patologie tumorali, nonché sulla sua storia personale di neoplasie e lesioni cutanee; inoltre è buona norma raccogliere informazioni sulle abitudini di esposizione solare del paziente e sul lavoro svolto, il quale potrebbe esporre il paziente a fattori di rischio. Inoltre a completamento del tutto valutare il fototipo corrispondente alle caratteristiche fisiche del paziente in modo da valutare il rischio a cui incorre a seguito di determinati comportamenti.

Eseguita la valutazione anamnestica si passa poi all'esaminazione cutanea la quale richiede determinate accortezze tra cui effettuare l'ispezione avendo cura di avere un'adeguata illuminazione, esaminare non solo i nei segnalati dal paziente ma effettuare una valutazione in toto della situazione e soprattutto non tralasciare determinate aree che per il loro essere più nascoste possono sfuggire all'attenzione come ad esempio il cuoio capelluto, la regione retro auricolare, i genitali, la congiuntiva e le mucose.

Un passo in avanti significativo nella valutazione di un sospetto melanoma è stata l'introduzione nel 1985 da parte di un gruppo di ricercatori dell'università di New York dei criteri "**ABCD**" con l'intento di educare e assistere tutta la classe medica nella differenziazione tra un nevo comune e un melanoma. A questi 4 criteri successivamente è stato aggiunto nel 2004 il criterio **E** diventando in questo modo l'acronimo "**ABCDE**" che è quello che oggi viene comunemente usato (3).

- A. ASIMMETRIA: Tracciando una linea immaginaria in orizzontale o in verticale che tagli a metà il nevo, le due parti risultanti non sono uguali l'una con l'altra
- B. BORDI: I bordi della lesione si presentano irregolari, frastagliati, definiti anche "a cartina geografica".

- C. COLORE: Solitamente il colore dei nevi è omogeneo mentre risulta non uniforme nei melanomi con variazioni e sfumature di colore che variano dal nero rosso al blu. Possono esserci presenti anche aree ipopigmentate le quali stanno ad indicare zone andate incontro a regressione tumorale.
- D. DIMENSIONE: Ogni nevo che risulti di dimensioni maggiori di 6 mm deve essere valutato con attenzione anche se non è esclusa la possibilità di trovare melanomi di piccole dimensioni.
- E. EVOLUZIONE: Il rapido cambiamento in forma, dimensioni o colore in tempi relativamente brevi (6-8 mesi) o anche un improvviso sanguinamento e/o ulcerazione deve destare il sospetto di malignità.

Questi criteri possono essere tutti contemporaneamente presenti oppure solo in parte, ma la loro presenza è senza dubbio un aiuto nell'individuare una lesione che richiede una maggior attenzione diagnostica. Nel tempo, siccome tali criteri non sempre sono sufficienti ad identificare determinati melanomi come il melanoma nodulare che ha rapida crescita ed è particolarmente aggressivo e proprio per le sue caratteristiche andrebbe intercettato precocemente, alcuni autori con questo fine hanno proposto l'aggiunta di altri 3 criteri EGF (3):

- E. ELEVATED: presenza di lesione rilevata
- G. GROWING: a rapida crescita
- F. FIRM: di consistenza dura

All'osservazione oltre a questi criteri si deve tener conto anche del cosiddetto "segno del brutto anatroccolo" secondo la quale ogni individuo ha la tendenza a sviluppare i nevi allo stesso modo, quindi quando viene individuato un nevo che morfologicamente si differenzia dagli altri, è necessario porre maggiore attenzione a quest'ultimo in quanto potrebbe rivelarsi maligno (40).

Solitamente il percorso diagnostico associa la visita dermatologica all'epiluminescenza o anche chiamata dermatoscopia. Questa metodica è diventata un valido aiuto nella diagnosi clinica di svariate patologie cutanee ma il suo ruolo principale si estrinseca nella valutazione diagnostica del melanoma. L'epiluminescenza si avvale di un device facilmente utilizzabile chiamato dermatoscopio manuale che è costituito da una fonte luminosa e da una lente che fornisce una magnificazione dell'immagine a 10x. Altre strumentazioni che possono essere

impiegate sono: lo stereomicroscopio, binoculare, e il videodermatoscopio, costituito da una sonda collegata ad un computer mediante fibre ottiche (39). Ritornando al dermatoscopio manuale questo grazie all'utilizzo sia della luce polarizzata che della luce non polarizzata è in grado di vedere oltre lo strato corneo e permette di valutare le strutture dell'epidermide, della giunzione dermoepidermica e delle papille dermiche non altrimenti apprezzabili alla semplice valutazione visiva. Il dermatoscopio a luce non polarizzata richiede un interfaccia liquida come ad esempio un gel ecografico, una goccia di olio da immersione, alcool o acqua da interporre tra lo strumento e la lesione da valutare, mentre impiegando quello a luce polarizzata l'utilizzo di un mezzo liquido non è richiesto, per tale motivo quest'ultimo può essere impiegato senza essere messo a contatto con la cute e si presta maggiormente alla valutazione delle strutture vascolari, in quanto in questo caso non vengono compresse dalla pressione esercitata dal dermatoscopio, e alla valutazione delle alterazioni della matrice(39).

La prima cosa da indagare alla visione dermatoscopica è il pattern appartenente a un determinato nevo: tra i vari abbiamo il pattern reticolare costituito da linee che solitamente hanno una tonalità tendente al marrone e forti che sono distribuiti in modo regolare e organizzato. Il pattern globulare invece ha come caratteristiche la presenza di strutture pigmentate arrotondate con una tonalità che va dal marrone al nero, le quali strutture ovalari possiamo riscontrare anche nel pattern cosiddetto a zolle ma in questo caso le loro dimensioni sono maggiori. Un pattern in cui vi è la completa assenza di reticolo è il pattern omogeneo nel quale invece riscontriamo pigmentazione diffusa e conforme che si può rilevare sia nei melanomi nodulari che nei nevi dermici. Pattern notevolmente caratteristico è quello che viene definito “starbust” o anche detto “a stella che scoppia”, riscontrabile in caso di nevo di Spitz, tra gli altri abbiamo il pattern parallelo tipico del melanoma acrale, quello polimorfo in cui si ritrova la presenza di 3 o più strutture dermatoscopiche (41).

Dopo aver inquadrato il pattern della lesione ci si focalizza sulla valutazione di elementi caratteristici che servono ad orientare maggiormente verso la diagnosi corretta:

- **Linee angolate:** Appaiono come linee marroni o grigie che si intersecano ad angolo retto e vanno a creare un pattern a zig zag. Eventualmente queste linee possono ulteriormente fondersi a formare strutture poligonali come dei romboidi (39).
- **Striature atipiche:** Queste sono delle proiezioni pigmentate lineari che si irradiano dal tumore verso la cute sana. Le striature tipiche sono quelle che si riscontrano nel nevo di Spitz ed in questo caso si distribuiscono in modo simmetrico lungo tutto il perimetro della lesione; al contrario in caso di melanoma le striature sono irregolari e

distribuiti in maniera non uniforme. Abbiamo due tipologie di strie: le strie radiali e gli pseudopodi (41).

- **Punti atipici (Atypical dots):** solitamente queste strutture tondeggianti hanno diametro inferiore a 0,1mm in maniera casuale alla periferia della lesione. Solitamente i dots di colore marrone sono correlati alla presenza di piccoli grappoli melanocitari a livello della giunzione dermoepidermica o dell'epidermide mentre quelli di un colore tendente al nero invece rivelano la presenza di accumulo di melanina a livello dello strato corneo (41).
- **Globuli atipici:** i globuli atipici hanno una dimensione maggiore di 0,1 mm variano da una forma rotondeggiante ad una ovalare con dimensioni, forma e colore variabili e distribuite in modo disorganizzato e disomogeneo. Alcuni globuli possono essere anche angolati andando a costituire un pattern caratteristico che è il pattern ad acciottolato (39).
- **Velo blu-biancastro:** è un'area che ha una colorazione che tende dal blu al bluastrò/nero che è ricoperta da una patina biancastra a vetro smerigliato. La colorazione bluastra è dovuta alla presenza di melanina contenuta dai melanociti localizzati a livello dermico mentre la patina biancastra è data invece da una componente ortocheratosica compatta (41). La differenza tra lesione benigna o maligna anche in questo caso è data dal fatto che il velo sia omogeneo e ricopra l'intera lesione (benigno) oppure in caso abbia una distribuzione asimmetrica si ha il sospetto di lesione maligna.
- **Strutture di regressione:** queste sono caratterizzate dalla presenza di aree depigmentate scar-like e da zone granulari (peppering), queste aree sono inoltre prive di vascolarizzazione (39). La granulosità invece è rappresentata da piccoli puntini blu-grigiastri posti o in corrispondenza dei melanofagi che si trovano a livello del derma papillare oppure a livello di depositi liberi di melanina. Le aree depigmentate vanno ad identificare delle zone che sono andate incontro a fibrodisplasia cutanea, appaiono di un colore bianco porcellana e assumono un colore leggermente più chiaro della cute circostante (41).
- **Macchia atipica (atypical blotch):** Questa consiste in una zona iperpigmentata senza una struttura tipica. Una macchia collocata al centro di un nevo con pattern reticolare viene considerato innocente mentre la presenza di una o più macchie poste in maniera disorganizzata e lontane dal centro della lesione è altamente sospetto di melanoma. la presenza di questo elemento va ad identificare una zona in cui la melanina viene a

localizzarsi in tutti gli strati dell'epidermide oppure la presenza di una elevata concentrazione di melanina nello strato corneo (39). Proprio a causa di questa elevata concentrazione di melanina la macchia oscura tutte le lesioni presenti al di sotto di essa.

- **Strutture vascolari atipiche:** Le strutture vascolari considerate atipiche sono quelle a forma di virgola, i vasi punteggiati, serpentini e con una forma che ricordano un cavatappi. Inoltre la presenza di zone rosse biancastre viene considerata atipica e probabilmente riflette la presenza di un aumento del flusso sanguigno dovuto a neo-angiogenesi. Il pattern più frequente in caso di melanoma è il pattern polimorfo che è costituito dalla presenza di 2 o più vasi all'interno della stessa lesione (39).

Solitamente i melanomi hanno la caratteristica di avere 1 o più elementi di cui sopra, e nessuno degli elementi è più importante degli altri quindi hanno tutti la stessa valenza diagnostica. Naturalmente più elementi si riscontrano a livello della lesione pigmentata, maggiore è la probabilità che nasconda una lesione maligna. La presenza di determinate caratteristiche è più peculiare di determinati melanomi piuttosto che di altri, ad esempio i melanomi nodulari che non mostrano quasi mai un pattern reticolare o strisce ma il più delle volte sono caratterizzati dalla presenza del velo blu biancastro o i vasi atipici.

In aggiunta alle metodiche di cui sopra abbiamo altre tecniche diagnostiche che vengono definite di secondo livello come la TBP (total body photography) e la SDDI (sequential digital dermoscopy imaging) che sono state introdotte per permettere una diagnosi sempre più accurata ma soprattutto precoce.

Tramite la TBP ci si avvale di fotografie dell'intera superficie corporea in modo da avere una visione generale ma soprattutto per poter poi confrontare nel tempo l'evoluzione di nevi sospetti e la comparsa di nuove lesioni. Solitamente vengono scattate 12–24 fotografie dell'intera superficie corporea, in questo modo si ha un punto di riferimento per le visite successive e l'importanza di questa metodica risiede nel fatto che il melanoma è una lesione che può insorgere ex novo o che può derivare da un nevo preesistente e quindi evolvere mostrando gradi diversi di cambiamenti nel tempo (42). Con l'introduzione di questa metodica si è visto una riduzione delle biopsie su nevi benigni e un miglioramento dell'accuratezza diagnostica nei pazienti che presentano melanoma. Secondo parecchi autori l'associazione tra la TBP (total body photography) e la dermatoscopia fa sì che i pazienti ad

alto rischio di sviluppare melanoma ricevano una diagnosi precoce ed inoltre secondo alcuni studi i melanomi diagnosticati utilizzando entrambe le metodiche in associazione si sono rivelati meno profondi rispetto a quelli diagnosticati utilizzando metodiche tradizionali. Uno studio australiano svolto per valutare l'impatto della TBP e dell'epiluminescenza nella diagnosi di melanoma in pazienti ad alto rischio ha rivelato che il 38% dei melanomi erano diagnosticati utilizzando solo la TPB o coadiuvati da essa (42).

La SDDI invece consta nell'acquisizione e valutazione di immagini successive acquisite tramite dermatoscopia digitale separate da determinati intervalli di tempo. L'intervallo di tempo può essere di 3 mesi e in questo caso si parla di "short term dermoscopy monitoring" che viene utilizzata per lesioni melanocitiche sospette senza alcuna evidenza dermatoscopica di melanoma, ma può anche essere di 6 mesi e si parla invece di "long term monitoring" per la sorveglianza di lesioni melanocitarie non sospette, solitamente utilizzata nei pazienti ad alto rischio con multipli nevi displastici (42). La SSDI viene utilizzata solamente per le lesioni piane o comunque non troppo profonde, infatti le lesioni sospette nodulari o quelle con un elevato grado di regressione non sono appropriate per questo tipo di monitoraggio. È stato dimostrato che questa metodica è particolarmente sensibile nel diagnosticare melanomi allo stato iniziale quando ancora non hanno le caratteristiche distintive morfologiche che ne permetterebbero la diagnosi, infatti secondo uno studio prospettico il 34% dei melanomi vengono identificati esclusivamente grazie alla SDDI. L'utilizzo di questa metodica ha permesso ai dermatologi di aumentare la sensibilità e la specificità delle diagnosi rispetto all'utilizzo del solo dermatoscopio manuale e ha inoltre ridotto le escissioni di lesioni melanocitarie poi rivelatesi benigne (42).

Una terza metodica diagnostica ancora più innovativa e moderna consiste nella RCM o meglio conosciuta come microscopia laser confocale. Questa è una metodica non invasiva e indolore che permette la valutazione dell'epidermide e dello strato superiore del derma conducendo ad una diagnosi con una sensibilità e accuratezza ancora maggiore delle lesioni neoplastiche e infiammatorie cutanee. La risoluzione dell'immagine derivante dall'utilizzo di questo strumento infatti si avvicina di molto all'immagine microscopica ottenuta con la biopsia, ma senza sottoporre il paziente ad un mini intervento chirurgico che comunque comporterebbe la somministrazione di un anestetico locale (42). Il device utilizzato (Vivascope 1500 o 3000) posizionato direttamente sulla cute, emette una luce laser a bassa potenza (830nm) che penetra attraverso la cute e la quale può essere riflessa o meno dalle strutture che incontra attraversando l'epidermide e il derma. Questa metodica permette di ottenere scansioni orizzontali dell'epidermide, della giunzione dermo-epidermica e del

derma superficiale in scala di grigi di un'area di 8mm x 8mm. Possiamo distinguere le strutture in iper-riflettenti come la melanina, la cheratina e il collagene che appariranno al RCM bianche/brillanti, mentre quelle iporiflettenti appariranno nere/grigio scure; a livello cellulare invece i melanociti, i cheratinociti pigmentati, i melanofagi e le componenti cellulari dell'infiammazione in quanto particolarmente riflettenti appariranno bianche o comunque chiare (39). La durata dell'acquisizione dell'immagine si aggira attorno a 3-10 minuti in base sia alla grandezza della lesione che allo strumento utilizzato. I criteri utilizzati per classificare le lesioni mostrano un'elevata sensibilità e specificità per la diagnosi di melanoma e altre lesioni cutanee maligne o benigne. In modo particolare i nevi sono normalmente caratterizzati da una architettura preservata della giunzione dermoepidermica con presenza di aggregati omogenei e rotondeggianti. La presenza di atipie citologiche in associazione a nidi giunzionali atipici (che mostrano una cellularità non omogenea) è fortemente suggestivo per nevo displastico, mentre la presenza di cellule pagetoidi lungo tutta l'epidermide o la presenza di cellule atipiche a livello della giunzione sono solitamente riscontrate nel melanoma. In base alle caratteristiche rilevate quindi si possono distinguere un melanoma "pagetoid type" formato da cellule di grandi dimensioni, rotondeggianti e di varie forme localizzate nell'epidermide, ed un melanoma "dendritic cell-type" caratterizzato dalla presenza di cellule dendritiche sia nell'epidermide sia a livello della giunzione disposte come numerose linee incrociate. Quindi l'RCM può essere un valido aiuto in tutte quelle occasioni in cui la clinica e l'immagine dermatoscopica sono equivocabili, ovviamente non è paragonabile alla diagnosi istologica ma può migliorare l'individuazione precoce di lesioni cutanee potenzialmente pericolose. Secondo diversi studi quindi l'RCM è uno strumento potente ed economico in grado di ridurre escissioni inutili e quindi costi inutili, ma al tempo stesso ha un rischio bassissimo di lasciarsi sfuggire melanomi (42).

Tra le metodiche di più recente introduzione abbiamo la Spettroscopia ad impedenza elettrica (EIS) la quale tramite l'applicazione di una corrente elettrica alternata va a valutare la resistenza di un determinato materiale e in questo modo si possono valutare lo stato clinico del tessuto; infatti le cellule di tipo neoplastico presentano alterazioni di forma, dimensione, orientamento e compattezza rispetto alle cellule sane. In base poi all'impedenza viene stilato uno score definito EIS score che va da 0 a 10, al di sotto di 4 il risultato dell'esame viene considerato negativo quindi la lesione non è maligna, mentre con un punteggio maggiore di 4 si tratta di una lesione maligna o potenzialmente tale. L'accuratezza di tale metodica è stata validata da uno studio internazionale e multicentrico che ha incluso 1951 soggetti rilevando

una sensibilità del 97% e una specificità del 34% se effettuata su lesioni destinate all'escissione chirurgica in quanto clinicamente sospette (39).

La diagnosi però effettiva e definitiva si fa solo eseguendo la biopsia e ad oggi questa ha acquisito sempre più importanza in quanto permette poi l'individuazione tramite varie tecniche come la real time PCR o il sequenziamento diretto dell'espressione di determinati recettori e mutazioni di essi che portano poi all'utilizzo di terapie target sempre più efficaci e specifiche. Secondo le linee guida stilate dalla British Academy of Dermatology un'escissione adeguata dovrebbe includere 2 mm di cute sana e una piccola porzione di grasso sottocutaneo mentre secondo l'American Accademy of Dermatology invece è consigliabile effettuare un'escissione comprendente 1-3 mm di cute sana. Solitamente la rimozione definitiva della lesione richiede una biopsia di tipo escissionale ma questa non è l'unica tipologia di biopsia possibile, infatti esistono altre 3 tipologie principali di biopsia: incisionale, biopsia per shaving e la saucerization biopsy.

La biopsia escissionale è considerata il gold standard per le lesioni che sono fortemente sospette di melanoma in quanto permette di valutare in modo corretto i margini, la profondità della lesione e l'architettura cellulare. Anche in questo caso trova la sua utilità la lampada di Wood che permette di identificare i margini e rilevare anche la pigmentazione subclinica. I margini di cute sana che vanno lasciati sono, come indicato dalle linee guida, 2-3mm includendo anche nel pezzo da inviare all'anatomopatologo il tessuto adiposo sottocutaneo. L'escissione viene eseguita sempre dopo iniezione di anestetico locale solitamente lidocaina associata a epinefrina. È importante orientare il campione in modo da facilitare il compito al patologo e fornirgli più informazioni possibili sulla lesione come la posizione anatomica, la descrizione della lesione e la diagnosi presunta effettuata con le altre metodiche diagnostiche. È importante che il pezzo operatorio sia integro in modo da permettere la corretta stadiazione del tumore e la possibilità di descrivere i parametri prognostici utili alla programmazione del trattamento successivo. Altro fattore da tenere ben presente è orientare longitudinalmente alla rete linfatica l'escissione della lesione in quanto in questo modo non si altera il tessuto linfatico e in caso sia necessario si potrà effettuare la biopsia del linfonodo sentinella (39).

La biopsia per shaving è semplice e veloce da eseguire. Solitamente si inizia andando a valutare i margini della lesione anche con l'aiuto di una lampada di Wood che va a scurire i bordi della lesione. Una volta individuati i margini, si procede con l'anestesia locale che prevede l'uso di lidocaina e si utilizza un bisturi o una lama di rasoio flessibile per asportare, se possibile per intero, la lesione e si lascia solitamente 1 mm di margine. Il fatto che la lama sia flessibile permette di poter angolare maggiormente la lama e quindi andare ad asportare in maggior profondità ma questo porterebbe alla formazione di una cicatrice depressa e ipopigmentata quindi questa metodica è solitamente scelta in caso di lesioni poco profonde, a filo pelle. Per la minima invasività e l'ottimo risultato estetico quindi è scelta in caso di lesioni a livello del viso o il dorso delle mani. Il maggior problema che si ha con questa tipologia di biopsia è quando viene scelta in modo inappropriato soprattutto in caso di lesioni particolarmente estese (39).

La biopsia incisionale solitamente si riserva a casi eccezionali in cui la biopsia escissionale comporterebbe interventi complessi o demolitivi (quindi in sede subungueale oppure in caso di nevi congeniti giganti o ampia lentigo maligna del volto, ecc.). Anche in questo caso è necessario identificare la porzione della lesione da asportare e sarebbe meglio fotografare prima la zona dove è localizzata la lesione da biopsiare. Durante l'incisione è necessario mettere in tensione la cute con le dita in modo da creare una piccola elisse che poi sarà la zona asportata. L'unico problema che si può riscontrare effettuando questa tipologia di biopsia è una potenziale errata interpretazione della profondità tumorale (39).

BIOPSIA DEL LINFONODO SENTINELLA: la biopsia del linfonodo sentinella è una procedura chirurgica in cui viene indagato il linfonodo che per primo drena la linfa dalla sede della neoplasia (può essere identificato anche più di un linfonodo sentinella) per la presenza di cellule tumorali al suo interno. È una metodica introdotta negli anni '90 per identificare le metastasi precoci e restringere il campo dei pazienti da sottoporre a dissezione completa linfonodale (39). Si esegue una linfoscintigrafia preoperatoria dopo aver somministrato al paziente tecnezio radioattivo nel sito del tumore primario e in assieme al blu di metilene in quattro zone attorno alla localizzazione del tumore primario. Il rilevamento dei linfonodo captante viene realizzato utilizzando una gamma camera e mediante la visione del colorante blu (43). Ad oggi è stata introdotta anche una metodica che sfrutta l'utilizzo del verde di indocianina che ha il vantaggio di non essere radioattivo e che quindi ad oggi viene

maggiormente utilizzato (44). Non tutti i pazienti necessitano della valutazione del linfonodo sentinella ma si effettua solo in determinate occasioni:

- In caso di melanomi T1b con uno spessore di Breslow che va da 0,8-1 mm e superiore
- In caso di melanomi T1b con uno spessore inferiore a 0,8 mm ma ulcerati,
- In caso di melanomi T1a ma con una forte componente di regressione (>75%)

DIAGNOSI ISTOPATOLOGICA E FATTORI PREDITTIVI:

Il patologo ad oggi per elaborare la diagnosi di melanoma si avvale non solo della mera visione al microscopio ottico dopo fissazione e colorazione, ma anche di nuove metodiche che si stanno facendo sempre più strada come ad esempio l'immunoistochimica, la microscopia elettronica la FISH e la real time PCR per la ricerca di mutazione di determinati geni, prima fra tutti BRAF.

Il campione tissutale ottenuto da una lesione primitiva o metastatica di melanoma può risultare estremamente eterogeneo in quanto può contenere oltre alla componente tumorale, tessuto normale, aree necrotiche, e aree ricche di cellule infiammatorie compresi macrofagi contenenti pigmento melanico. Per poter fare diagnosi di melanoma il patologo necessita di tutta una serie di caratteristiche che lo contraddistinguono dalla sua controparte nevica. Si va quindi a valutare il pattern di crescita, la morfologia citologica e le alterazioni del microambiente che si vanno a creare come la presenza di infiammazione di sclerosi reattiva (39). L'esame solitamente inizia dando uno sguardo generale a basso ingrandimento all'architettura complessiva del tessuto, valutando le dimensioni e la simmetria della lesione, in un secondo momento si valutano i bordi del campione citologico. In caso la lesione sia stata asportata in toto un hallmark di melanoma è la presenza di una scarsa circoscrizione laterale che si evidenzia con una fila di melanociti solitari, irregolarmente distanziati. Successivamente si passa allo studio della componente giunzionale del campione. Dopo che l'architettura è stata esaminata attentamente, occorre prestare attenzione alle caratteristiche citologiche. I melanociti maligni possono variare forma da epitelioidi a cellule con forma fusata e di dimensioni variabili da piccoli a tipi di cellule grandi e persino rigonfie. Spesso, le classiche caratteristiche citologiche maligne come il marcato pleomorfismo, la presenza di molti nuclei all'interno della stesa cellula, ipercromasia e la presenza di mitosi atipiche sono particolarmente evidenti e presenti (39). La presenza di mitosi soprattutto in prossimità della base della lesione è un reperto sospetto mentre l'1% dei nevi può dimostrare 1-2 mitosi superficiali pur essendo totalmente benigno. Le caratteristiche più fini includono la mancanza di maturazione della componente dermica, con la presenza di melanociti pleomorfi alla base

della lesione. Alcune lesioni dimostrano pseudo-maturazione, dove la dimensione complessiva della cellula diminuisce a causa della perdita del citoplasma, ma rimane un elevato rapporto nucleare / citoplasmatico. Il melanoma in genere suscita una distintiva reazione nel derma, inclusa la presenza di un derma papillare espanso e sclerotico, aumento dell'infiltrato linfocitario e la comparsa di irregolari ciuffi di macrofagi carichi di melanina. Queste sarebbero le caratteristiche ideali che occorrerebbe andare ad individuare in ogni campione istologico, ma non sempre sono così chiare e lampanti, infatti spesso la gran parte delle lesioni dimostrano solo alcune anomalie e quindi si sovrappongono ai nevi benigni. In questo caso e in tutti quei casi di diagnosi incerta il patologo si può avvalere dell'uso dell'immunoistochimica. L'immunoistochimica è in grado di individuare specifiche proteine o strutture del compartimento intra- ed extra-cellulare. Tale tecnica si basa sul principio di coniugazione antigene anticorpo in addizione poi con sistemi di rivelazione (enzimatici, fluorescenti) che ne rendono visibile l'avvenuta reazione. In particolare per la diagnosi di melanoma si va ad indagare la presenza di determinate proteine come Melan-A/Mart-1, Sox10, e MITF. Prima veniva utilizzato S100 che è stato sostituito da Sox10 in quanto mancava di specificità. Anche l'anticorpo monoclonale HMB-45 viene spesso utilizzato per identificare l'antigene tumorale gp-100 che viene spesso rinvenuto in tutto lo spessore della componente dermica del melanoma (39). L'immunoistochimica è un valido aiuto anche per valutare la proliferazione cellulare con Ki-67 che ha sia una funzione diagnostico che prognostico (3). Mentre molti melanomi presentano un indice di proliferazione che si sovrappone

con nevi benigni, un indice proliferativo maggiore di 10% è quasi sempre diagnostico di melanoma. PHH3 è un marker cellulare che si lega a cellule che si stanno replicando attivamente e può fornire una valutazione accurata del numero di mitosi in una lesione (39).

Una volta effettuata la diagnosi di melanoma il patologo redige il referto istologico che deve contenere tutte le informazioni utili che hanno valore prognostico e che sono importanti ai fini dell'instaurazione di una terapia efficace:

- **Istotipo:** Come precedentemente detto il melanoma si divide in 4 istotipi principali che sono il melanoma a diffusione superficiale che è il più comune in assoluto, il melanoma nodulare, la lentigo maligna/melanoma e il melanoma lentiginoso acrale. A questi che sono i classici si sono aggiunti il melanoma desmoplastico/neurotrofo, il melanoma insorgente su nevo blu, il melanoma insorgente su nevo congenito gigante e

il melanoma nell'infanzia. Ad oggi però non è considerato in base alle nuove linee guida un fattore prognostico indipendente (3).

- **Fase di crescita:** La fase di crescita del melanoma si distingue in verticale e/o radiale e condiziona in maniera determinante la prognosi. La fase di crescita radiale corrisponde ad una fase non tumorigenica, caratterizzata dalla proliferazione di melanociti nell'epidermide e/o nel derma papillare, senza formazione di nodulo tumorale. La fase di crescita verticale rappresenta la fase tumorigenica nella quale il melanoma acquisisce la capacità di metastatizzare ed è caratterizzata morfologicamente dalla presenza di un nodulo espansivo di dimensioni maggiori rispetto agli aggregati intraepidermici e/o dalla presenza di figure mitotiche nella componente invasiva. Per tutti i melanomi è quindi consigliato riportare questa informazione apparte che per l'istotipo nodulare in quanto questo è per definizione a crescita verticale (39).
- **Spessore di Breslow:** è il fattore prognostico fondamentale e più importante per i melanomi infiltranti: va misurato con il microscopio (oculare micrometrico) nella sezione in cui il melanoma è più spesso, senza includere la componente superficiale (strato corneo), ovvero partendo dallo strato granuloso della cute o dalla superficie ulcerata fino al punto di massima infiltrazione. Questo parametro è stato descritto per la prima volta da Alexander Breslow nel 1970. Lo spessore può essere valutato solo accuratamente nelle sezioni tagliate perpendicolarmente all'epidermide. In caso di cute ulcerata la profondità di Breslow è misurata dalla base dell'ulcera sovrastante (45). In base a questo spessore vengono definite le categorie T nell'ottava edizione dell'AJCC staging system T1–T4 che sono definite come (T1: 0–1,0 mm, T2: > 1,0–2,0 mm, T3: > 2,0–4,0 mm, T4: > 4,0 mm). La categoria T1 è suddivisa nel modo seguente: T1a: 0–0,8 mm e T1b: > 0,8–1 mm. Se lo spessore del tumore non può essere valutato, il tumore viene valutato come TX. Il melanoma in situ è riportato come Tis. Pazienti invece con melanoma completamente regredito sono classificati come T0 (3).
- **Livelli di invasione di Clark:** I livelli di Clark indicano quanto il fronte di infiltrazione del tumore stia avanzando tra i vari strati della cute; ovviamente più il tumore è superficiale migliore è la prognosi; Tali livelli sono: I Livello: tumore intraepidermico, II livello: infiltrazione parziale del derma papillare, III livello: infiltrazione totale del derma papillare, IV livello: infiltrazione del derma reticolare, V livello: infiltrazione del tessuto adiposo sottocutaneo. Il livello di Clark non è incluso nell'ottava e ultima edizione dell'AJCC staging system in quanto considerato meno

preciso rispetto allo spessore di Breslow e scarsamente riproducibile in quanto non sempre è facile distinguere i vari strati della cute, in particolare il confine tra derma papillare e reticolare in particolar modo in un soggetto con elastosi dovuta all'esposizione attinica. Il livello di invasione di Clark ad oggi è stato sostituito dalla conta delle mitosi (3).

- **Ulcerazione:** L'ulcerazione (che può essere presente o assente) è definita come l'assenza dell'intero spessore del epidermide, ed è accompagnato da un reattivo cambiamento con deposizione di fibrina e la presenza di neutrofili. La presenza di ulcerazione ha un valore prognostico negativo; però bisogna prestare attenzione nel distinguere un'ulcerazione neoplastica da una post-traumatica). Uno dei migliori metodi per valutarla è vedere se il melanoma è in continuità con l'ulcera; infatti l'ulcerazione neoplastica avviene perché il melanoma infiltra la cute e quando l'ha occupata per gran parte, essa si ulcera. In uno studio recente che coinvolgeva 4.661 pazienti, la sopravvivenza a 5 dopo melanoma era significativamente migliore nei pazienti con un diametro dell'ulcera <5 mm rispetto a quelli con un melanoma ampiamente ulcerato (> 5 mm) (45). Alla luce di queste evidenze nell'ottava edizione dell'AJCC staging system è indicato di andare a misurare la massima estensione dell'ulcerazione utilizzando un micrometro oculare. La presenza di ulcerazione inoltre tende a predire una maggior probabilità di metastatizzazione a livello viscerale e osseo (3).
- **Indice mitotico:** L'attività proliferativa del melanoma infiltrante è rilevante per la prognosi del melanoma, a parità di spessore. È importante soprattutto nei tumori con fase di crescita verticale in quanto pazienti con melanoma a crescita verticale ed indice mitotico elevato hanno un aumentato rischio di progressione rispetto a pazienti con basso indice mitotico. Si conta il numero di mitosi/mm² (a forte ingrandimento) nell'area più mitoticamente attiva che viene chiamata "hot spot" ed estendendo la conta ai campi adiacenti per un'area complessiva di 1 mm². (45) Ora l'attività mitotica non è più stadiale ma ha solo valore prognostico in quanto viene utilizzata per la scelta della terapia; la conta mitotica va effettuata sulle sezioni originali colorate con EE. (3)
- **Linfociti infiltranti il tumore (TILs):** l'infiltrazione linfocitaria nel melanoma è un fattore prognostico favorevole e può prevedere tassi più bassi di positività del linfonodo sentinella. I linfociti infiltranti il tumore (TIL) sono definiti come linfociti che circondano e si estendono nei nidi e nelle singole cellule tumorali di un melanoma.

L'infiltrato cellulare può essere classificato come assente, non vivace e vivace (brisk) (45). Per poter classificare un tumore come vivace i linfociti devono o infiltrarsi nell'intera base del tumore o devono permearlo diffusamente. Per quanto riguarda la definizione di non vivace "non brisk" i linfociti presenti sono pochi e raggruppati in piccoli focolai, mentre in caso di infiltrato assente non è rilevata presenza di linfociti nella componente proliferativa verticale (3).

- **Regression:** La regressione tumorale di un melanoma che si può classificare come presente o assente si verifica quando la risposta immunitaria dell'ospite provoca la distruzione di tutto o una parte del melanoma primario (3). Istologicamente, la regressione è caratterizzata da assenza di melanoma, associata a fibrosi superficiale e/o sclerosi e ad una cospicua presenza di linfociti e melanofagi. La semplice presenza di fibrosi, infiammazione, e / o melanofagi nelle vicinanze di tumore vitale non equivale a regressione, poiché ciò richiede la completa assenza di tumore. La regressione è spesso irregolare all'interno di un tumore e se i cambiamenti di regressione sono annotati al margine dovrebbe essere presa in considerazione una nuova escissione (45) . Il significato prognostico della regressione è tutt'oggi una questione dibattuta. Anche se è stato dimostrato che fa presagire una prognosi peggiore nei melanomi sottili , una sistematica revisione comprendente 10.098 pazienti ha mostrato una minore incidenza della positività del linfonodo sentinella nei tumori con regressione rispetto a quelli senza. È probabilmente che i vari risultati di questi studi derivino in parte dalla mancanza di una definizione standardizzata o criteri per la diagnosi di regressione, nonché scarsa riproducibilità tra gli osservatori(3).
- **Microsatellitosis:** La microsatellitosis è definita come la presenza di focolai tumorali microscopici o all'interno del derma o nel tessuto adiposo sottocutaneo adiacente, ma comunque in discontinuità dal melanoma primario. I microsatelliti quindi per essere definiti tali devono essere separati dal tumore primitivo o dal derma normale ma non da tessuto adiposo o da tessuto infiammatorio. Questi in precedenza erano definiti quando le dimensioni erano maggiori di 0,05 mm e quando erano situati ad almeno 0,3 mm dalla principale massa tumorale. Tuttavia, l'ottava edizione dell'AJCC ha aggiornato questo parametro eliminando la dimensione o distanza minima, automaticamente la presenza di microsatellitosis configura uno stadio clinico III . La presenza di microsatelliti è un fattore prognostico avverso nel melanoma primario in quanto determina un impatto considerevole sulla prognosi ed è predittivo sia di

incremento di rischio di ricaduta a livello cutaneo che di coinvolgimento linfonodale locale (3).

- **Invasione linfovaskolare:** Consiste in un infiltrazione da parte delle cellule tumorali di entrambe le componenti vascolare e linfatica ovvero quindi avremo la presenza di trombi neoplastici nei vasi. Questo è indicativo di invasività ed è un fattore prognostico negativo. Si parla genericamente di invasione “linfo-vascolare” perché non è facile distinguere un vaso linfatico da un capillare dilatato o da una venula post--capillare, a causa dell'assenza di una parete vascolare: ci sono però dei marker che ci permettono questa discriminazione, che in genere non vengono utilizzati perché tra le varie infiltrazioni non cambia il significato prognostico (3).
- **Infiltrazione perineurale.** L'infiltrazione peri-neurale è la diffusione del melanoma lungo i tronchi nervosi preesistenti, all'interno della guaina del nervo periferico. E' un fattore prognostico negativo, indicativo della possibilità da parte del tumore di dare metastasi a distanza, ma è meno significativa dell'infiltrazione linfo-vascolare (3).
- **Valutazione del linfonodo sentinella (in caso di asportazione durante l'intervento).** Questo è un importante fattore prognostico. Per le modalità di refertazione del linfonodo sentinella è consigliato attenersi alle raccomandazione dell'EORTC melanoma Group: quindi è necessario indicare nel referto: la presenza o assenza della metastasi, la sede della metastasi che può trovarsi in sede sottocapsulare, parenchimale o combinata (sottocapsulare e parenchimale), estesa confluyente ed estesa multifocale; la dimensione massima del focolaio metastatico maggiore (misurato in mm e approssimato all'0,1mm, specificando la sede; il numero di metastasi presenti; specificare la presenza o meno di estensione extracapsulare, riportare la presenza o meno di cellule nevice capsulari e/o trabecolari; In base alle linee guida AJCC attuali e passate si riconoscono due categorie di coinvolgimento del linfonodo sentinella nel melanoma: micrometastasi clinicamente occulta e macrometastasi clinicamente evidente (45). Il melanoma micrometastatico è definito come la presenza di cellule maligne positive per almeno un marcatore immunoistochimico come S-100, HMB-45, Melan-A / Mart1 o Sox10. S-100 ha la massima sensibilità e Melan-A si avvicina a questo ma più recentemente è stato utilizzato Sox-10 che ha una sensibilità equivalente a S-100, ma con una specificità aggiunta, perché a differenza di S-100 questa risulta negativa nelle cellule dendritiche e nei macrofagi. Nell'ottava edizione dello schema AJCC, la valutazione dello stato linfonodale del melanoma dipende dalla numero di linfonodi coinvolti, dalla presenza di metastasi in transit, dalla presenza di

metastasi satellitari e dal fatto se il tumore è se la presenza del tumore nel linfonodo sentinella è stato rilevato o clinicamente o a seguito della stadiazione.

- **Stato dei margini laterale e profondo:** è fondamentale che il patologo riporti se i margini sono liberi da tumore o rivelino ancora la presenza di una componente tumorale. In caso di margini ancora interessati da tumore infatti sarà necessario un secondo intervento chirurgico per allargare l'escissione ed evitare possibili secondarismi.
- **Componente nevica associata**
- **Elastosi solare dermica**
- **Stadiazione**

STADIAZIONE:

Ovviamente come riportato sopra nel referto anatomopatologico non può mancare la stadiazione TNM che deve essere redatta seguendo le linee guida indicate dall'ultima e ottava versione dell' "American Joint Committee on Cancer" pubblicate nell'ottobre 2016 ed entrate in vigore a gennaio 2018. Il sistema TNM è un sistema internazionale che ha lo scopo di classificare le neoplasie in stadi in modo da valutare l'avanzamento della patologia tumorale. È stato introdotto per la prima volta nel 1946 da Pierre Denoix e tiene conto di tre diversi parametri che sono (3):

- T: Indica l'estensione del tumore primitivo e quindi in questo caso tiene conto del parametro dello spessore tumorale in base al quale si distinguono 4 stadi che vanno da T1 a T4, a questo si aggiunge anche la lettera minuscola "a" o "b" in base alla presenza o meno di ulcerazione.
- N: Questo parametro si occupa di valutare lo stato linfonodale. Tale parametro va da N0 in cui non si ha coinvolgimento dei linfonodi loco regionali fino ad N3. Allo stesso modo del parametro T vi è anche qui la distinzione tra "a" e "b" e in aggiunta anche il parametro "c" che in questo caso tiene conto della presenza di micrometastasi(a), macrometastasi(b) o metastasi in transit/satelliti(c).
- M: Valuta la presenza di metastasi a distanza, è l'unico dei tre parametri che solitamente non viene valutato dall'anatomopatologo ma è più che altro un parametro clinico, In base al tipo e alla localizzazione delle metastasi a distanza vi è un'ulteriore suddivisione in M1a, M1b ed M1c.

<i>Categoria T</i>	<i>Spessore di Breslow</i>	<i>Ulcerazione</i>
TX: lo spessore del tumore primario non può essere valutato	Non applicabile	Non applicabile
T0: non c'è evidenza del tumore primario	Non applicabile	Non applicabile
Tis (melanoma in situ)	Non applicabile	Non applicabile
T1 ≤ 1,0 mm		
T1a	a < 0,8 mm	Assente
T1b	b < 0,8 mm	Presente
	0,8-1,00 mm	Assente/Presente
T2 > 1,00-2,00		
T2a	a > 1,00-2,00 mm	Assente
T2b	b > 1,00-2,00 mm	Presente
T3 > 2,00-4,00 mm		
T3a	a > 2,00-4,00 mm	Assente
T3b	b > 2,00-4,00 mm	Presente
T4 > 4,00 mm		
T4a	a > 4,00	Assente
T4b	b > 4,00	Presente
<i>Categoria N</i>	<i>N° di linfonodi regionali coinvolti</i>	<i>Metastasi in transit, satelliti, e/o microsatellitosi</i>
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 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
N3	4 o più linfonodi coinvolti oppure metastasi in-transit, satelliti, e/o microsatellitosis con 2 o più linfonodi regionali coinvolti oppure qualsiasi numero di pacchetti linfonodali (linfonodi confluenti) con o senza metastasi in transit, satelliti e/o microsatellitosis	
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
Metastasi	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

Tra gli aggiornamenti della nuova edizione vi è l'esclusione del tasso mitotico definito come il numero di mitosi presenti per mm². Era stato precedentemente utilizzato per sottocategorizzare le lesioni T1 nella 7a edizione AJCC, ma nella nuova pubblicazione lo spessore del tumore primitivo e l'ulcerazione sono gli unici fattori patologici necessari utilizzati per determinare la categoria T. Nonostante ciò gli esperti raccomandano vivamente di continuare a valutare il tasso mitotico per tutti i pazienti con melanoma cutaneo infatti il tasso mitotico è una componente importante della valutazione complessiva del rischio per pazienti con melanoma cutaneo e probabilmente continuerà ad essere incluso tra gli strumenti clinici per la valutazione del rischio al fine di individuare la strategia terapeutica più adatta (45). In questa nuova edizione AJCC la sottocategoria M si basa su due fattori: sede anatomica delle metastasi a distanza e il livello sierico di lattato deidrogenasi (LDH). Il sistema di stadiazione quindi preserva l'uso del livello di LDH in M1, ma la sua classificazione è stata leggermente modificata: piuttosto che designare tutti i pazienti con livelli elevati di LDH e malattia metastatica come M1c indipendentemente dalla sede anatomica della metastasi malattia, l'8a edizione fornisce un nuovo suffisso di (0) o (1), per rappresentare l'assenza o presenza di un livello di LDH elevato, rispettivamente (3). È noto che i livelli sierici di LDH sono associati alla prognosi del melanoma in stadio IV e sono incorporati nel sistema stadiativo. Più recentemente, sono stati studiati nuovi marcatori tumorali, i profili immunologici e i livelli di cellule tumorali circolanti nel tentativo di identificare la malattia metastatica occulta o monitorare la risposta alla terapia. Un recente progresso è la cosiddetta biopsia liquida che è in grado di identificare la circolazione di cellule tumorali, il DNA circolante o microRNA circolante. Questo approccio sembra essere correlato alla sopravvivenza, dimostrando di essere un criterio promettente nella sorveglianza e nella diagnosi del melanoma e altri tumori solidi. Anche gli esosomi, piccole vescicole secrete costituite dalla membrana cellulare, possono partecipare attivamente alla segnalazione della presenza del tumore, infatti è possibile rilevare nel siero esosomi circolanti contenenti concentrazioni minime di biomarcatori che fanno presagire la presenza di melanoma, come MIA e S100B, che possono essere rilevati e quantificati per scopi diagnostici e prognostici. Sono stati indagati anche altri marcatori sierici oltre a LDH specifici per il melanoma nel tentativo di fornire ulteriori informazioni prognostiche come ad esempio, MIA, S100 e YKL-40. (39) È stato dimostrato che livelli elevati di LDH correlano con scarsa sopravvivenza nei pazienti trattati con il farmaco immunoterapico anti-CTLA-4 ipilimumab

A seguito della determinazione di questi tre parametri viene realizzata la stadiazione; Va ricordato che ci sono due tipologie di stadiazione: clinica e patologica;

La stadiazione clinica comprende la microstadiazione del melanoma primitivo e la valutazione clinico/radiologica delle metastasi mentre la stadiazione patologica include la microstadiazione del melanoma primitivo e la valutazione patologica dei linfonodi regionali dopo linfadenectomia parziale (ad es. linfonodo sentinella) o totale (3).

Stadiazione clinica:

<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>cTNM</i>
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

Stadiazione patologica:

<i>T</i>	<i>N</i>	<i>M</i>	<i>pTNM</i>
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 o N2c	M0	IIIC
T1a/b-T2a	N1a o N2a	M0	IIIA
T1a/b-T2a	N1b/c o N2b	M0	IIIB
T2b/T3a	N1a-N2b	M0	IIIB
T1a/T3a	N2c o N3a/b/c	M0	IIIC
T3b/T4a	Qualsiasi N $\geq$ N1	M0	IIIC
T4b	N1a-N2c	M0	IIIC
T4b	N3a/b/c	M0	IIID
Qualsiasi T, Tis	Qualsiasi N	M1	IV

TRATTAMENTO:

Terapia chirurgica

Il trattamento elettivo per il melanoma primitivo è l'exeresi chirurgica che consiste nella rimozione in blocco del tumore primitivo intatto con margine di cute sana rispetto ai limiti visibili della neoplasia. Con una diagnosi precoce, oltre il 90% di tutti i melanomi in fase precoce possono essere curati solo mediante escissione chirurgica. La radicalità della chirurgia è richiesta già dallo stadio di melanoma in situ per tre semplici motivi: il primo è che molto spesso quelli che vengono classificati come melanomi in situ sono in realtà già invasivi, il secondo è che anche se non è invasivo potrebbe in futuro diventarlo, il 23% dei melanomi in situ infatti si ripresentano come melanoma invasivo con uno spessore medio di Breslow di 0,9mm, e il terzo è che il trattamento poi delle lesioni ricorrenti è più complicato (39). Come accennato prima è necessario garantire un margine di sicurezza soprattutto nel caso in cui la lesione non sia visibile nella sua interezza, per questo sono state stilate delle linee guida per l'escissione le quali sono cambiate frequentemente negli anni in modo da riflettere le evidenze mediche. L'approccio operativo standard in passato di solito includeva un margine di 3-5 cm di cute sana misurata dal bordo esterno del melanoma in tutte le direzioni, con la maggior parte dei pazienti che richiedono un innesto cutaneo a spessore parziale per coprire il risultante difetto. Nel 1992 si raccomandava per il melanoma in situ un margine di 5mm, da allora, più studi hanno dimostrato che un margine di escissione di 5 mm è inadeguato, in quanto si è documentato essere indenne nel 23/86% di tutte le lesioni MIS. Secondo alcuni studi per ottenere un tasso di margini sani attorno al 97% è necessario avere

un margine di escissione di 9 mm. L'asportazione del melanoma in situ solitamente viene svolta seguendo la tecnica chirurgica di Mohs denominata anche chirurgia microscopicamente controllata. Questa consente a seguito dell'asportazione di poter svolgere un esame istologico e in particolare dei margini preciso e mirato, sia in estemporanea sia mediante sezioni crioconservate in modo da avere una visione completa a 360° del coinvolgimento dei margini (1). Secondo le linee guida NCCN (The National Comprehensive Cancer Network) per un melanoma in situ, si consiglia un margine di escissione di 5 mm. Per un melanoma cutaneo localizzato a livello del tronco o delle estremità prossimali invece i margini da lasciare variano in base allo spessore di Breslow: se inferiore a ≤ 1 mm le raccomandazioni sono di eseguire un'ampia escissione locale con un margine di 1 cm. Nel caso di melanoma con spessore tra 0,76 e 1,0 mm si valutano i rischi e benefici di un'escissione allargata a seguito dello studio del linfonodo sentinella. Per un melanoma allo stadio IB o II con spessore tra 1-2 mm deve essere eseguita un'ampia escissione locale con margini di 1-2 cm, con concomitante biopsia del linfonodo sentinella. In caso sia di lesioni con spessore tra i 2 e i 4 mm ma anche ≥ 4 mm i margini consigliati sono 2 cm. Per quanto riguarda i melanomi localizzati a livello di testa-collo, estremità distali o aree esteticamente sensibili dovrebbe essere lasciato almeno un margine di 1 cm nel caso di melanomi con spessore > 1 mm. La completa escissione chirurgica dovrebbe ancora essere presa in considerazione anche in caso di malattia al IV stadio se il paziente è un candidato favorevole ed in questo caso potrebbe ancora rivelarsi una chirurgia di tipo curativo mentre se il paziente si presenta con malattia non resecabile e localizzazioni metastatiche multiple dovrebbe essere presa comunque in considerazione il trattamento chirurgico questa volta attuato con finalità palliative quindi nel tentativo di migliorare la qualità della vita del paziente (39). La valutazione dello spessore di Breslow è da tenere in conto anche per attuare un secondo intervento che solitamente segue la l'escissione chirurgica che è la biopsia del linfonodo sentinella. Per melanomi con spessore inferiore a 1 mm infatti il rischio di trovare cellule neoplastiche a livello linfonodale è abbastanza raro mentre raggiunge fino il 60% in caso di melanomi con spessore maggiore di 4 mm. Per questo motivo la condotta terapeutica adeguata nei melanomi con spessore > 1 mm o con spessore $> 0,75$ mm e compresenza di fattori di rischio addizionali quali ulcerazione e indice mitotico $\geq 1/\text{mm}^2$ è raccomandata la biopsia del linfonodo sentinella. Tale tecnica, fondata sull'ipotesi che microemboli neoplastici possano diffondere lungo i vasi linfatici raggiungendo primariamente il linfonodo drenante più vicino alla sede della neoplasia, consiste nell'esecuzione di una linfoscintigrafia preoperatoria seguita poi da una linfografia intraoperatoria. Il linfonodo sentinella viene quindi asportato e analizzato dall'anatomopatologo: a questo punto gli scenari

possibili sono due: l'esame viene negativo quindi il linfonodo è privo di coinvolgimento neoplastico e si conclude qui l'indagine. La seconda opzione invece che implica la positività del linfonodo asportato richiede una linfadenectomia di completamento, come originariamente sostenuto da Morton anche se questo non è sempre vero (46). Infatti in caso di linfonodo sentinella positivo istologicamente secondo uno studio pubblicato da Faries et al la DMFS (distant metastasis free survival) non differiva significativamente tra il gruppo sottoposto a dissezione e il gruppo sottoposto a osservazione, a supporto di questo un altro studio di Leiter et al del 2016 che però non è stato portato a termine aveva fornito gli stessi dati. Per questo motivo secondo le linee guida AIOM del 2019 in caso di micrometastasi l'esecuzione della dissezione linfonodale di completamento valutando i rischi e i benefici non è consigliabile (3). In base a un recente studio clinico (Morton et al 2014) che ha confrontato i vantaggi della biopsia del linfonodo sentinella vs la semplice osservazione si è evidenziato che i pazienti con melanoma di spessore intermedio (1,2-3,5mm) avevano un significativo vantaggio in termine di DFS (disease free survival) rispetto ai pazienti che non erano stati sottoposti alla biopsia del linfonodo sentinella. (71.3% vs 64.7 DFS a 10 anni). Nello stesso gruppo di pazienti con spessore intermedio inoltre il tasso di sopravvivenza specifico per il melanoma a 10 anni era del $62,1 \pm 4,8\%$ tra quelli con metastasi del linfonodo sentinella rispetto all' $85,1 \pm 1,5\%$ tra quelli con linfonodo sentinella negativo mentre nel gruppo di pazienti con melanomi con spessore maggiore di 3,5mm i rispettivi tassi erano $48,0 \pm 7,0\%$ e $64,6 \pm 4,9\%$. In un'analisi multivariata riportata nello studio lo status del linfonodo sentinella era il più importante fattore in grado di predire recidiva di malattia o morte da melanoma (47). Quindi considerato anche il fatto che il tasso delle complicanze chirurgiche legate all'asportazione del linfonodo sentinella è molto basso la raccomandazione ad effettuare lo studio del linfonodo sentinella è forte in pazienti con melanoma T1b e maggiore.

In caso quindi di malattia metastatica regionale (stadio III) in cui a seguito di osservazioni cliniche e/o strumentali è stato riscontrato coinvolgimento linfonodale il primo trattamento da prendere in considerazione è la rimozione chirurgica della cicatrice e conseguente allargamento in base allo spessore riscontrato. Va accompagnata a linfadenectomia radicale portando al completo svuotamento della sede dei linfonodi regionali, in base alla sede del melanoma primario quindi potremo avere tre tipologie diverse di dissezione (1):

- Linfadenectomia cervicale: esistono tre tipi di dissezione linfonodale cervicale: dissezione radicale del collo, dissezione radicale modificata del collo e dissezione selettiva del collo. La radicale include la resezione del muscolo

sternocleidomastoideo, il nervo accessorio spinale e la giugulare interna ma è poco utilizzata in quanto ha una elevata morbidità. Nella radicale modificata invece vengono risparmiate queste strutture

- Svuotamento ascellare: comprendente i linfonodi dei tre livelli ascellari en bloc comprendendo o meno il muscolo piccolo pettorale
- Dissezione inguino-cruro-iliaca: comprendente i linfonodi inguinali superficiali e profondi, iliaci esterni e otturatori (39).

Questi interventi non sono però scevri da complicanze le quali sono frequentemente dolore e linfedema soprattutto per lo svuotamento ascellare mentre l'infezione della ferita è molto comune a seguito della dissezione inguino-scrotale ma comunque anche dolore e linfedema sono presenti.

In caso di pazienti con presenza di malattia metastatica regionale o metastasi in transit a livello degli arti il trattamento è particolarmente impegnativo. Inizialmente l'unica opzione terapeutica era l'amputazione dell'arto coinvolto ma in seguito questa è stata abbandonata a favore della ILP (perfusione dell'arto isolato). Temporaneamente durante la procedura l'arto viene isolato dalla circolazione sistemica e perfuso con tecniche di circolazione extra-corporea per circa 2 ore. In una fase esclusivamente ipertermica il sangue prima di essere reintrodotta nell'arto viene portato a temperatura elevata, quando poi vengono raggiunti i 41.5° viene introdotto anche il farmaco citostatico. Questo viene fatto circolare per 60-90 minuti dopodiché viene eseguito un wash out per eliminare il farmaco rimanente (1). Dopo questa procedura si sono riscontrati tassi di risposta completa (CR) dal 7 al 91% con una mediana del 46%) e sono stati segnalati tassi di risposta parziale (PR) dello 0-44% (mediana 34%). Con questa tecnica è stato possibile evitare l'amputazione dell'arto interessato oltre il 90% dei casi. Nonostante però questi risultati generalmente soddisfacenti, la tecnica ILP presenta alcuni importanti svantaggi: infatti si tratta di una procedura tecnicamente complessa e comporta un approccio chirurgico invasivo. Proprio per questo motivo dopo innumerevoli tentativi all'inizio degli anni '90, Thompson e colleghi presso la Sydney Melanoma Unit ha sviluppato una semplice procedura minimamente invasiva è stata battezzata come ILI (infusione dell'arto isolato). Usando questa nuova tecnica è stato possibile ottenere i benefici dell'ILP senza incorrere nei suoi principali svantaggi. ILI è essenzialmente una IPL a basso flusso eseguita tramite posizionamento percutaneo di cateteri in condizioni ipossiche. Questa tecnica, ha dato tassi di risposta simili a quelli conseguiti in seguito ILP (39). Il farmaco maggiormente utilizzato per questa procedura è il melfalan (farmaco antitumorale appartenente alla famiglia degli agenti alchilanti) anche se a questo nei centri più avanzati

viene aggiunta anche l'actinomicina in quanto si ottengono ottimi tassi di risposta senza aumentare la tossicità ma anche il TNF α (in caso di malattia molto estesa, > di 5 mm o > di 5 lesioni) (39).

Anche se sembrerebbe contraddittoria utilizzare una terapia di tipo chirurgica per una malattia metastatica (IV stadio) (quindi per definizione sistemica) in realtà non lo è, o meglio non in tutte le occasioni. Infatti la terapia locale di escissione per metastasi resecabili può avere un potenziale curativo se non altro in caso di malattia oligometastatica limitata oppure può avere finalità esclusivamente palliative e per questo non meno importante in quanto fondamentale per la gestione dei sintomi ad esempio per il trattamento delle metastasi cerebrali le quali spesso sono resistenti alla terapia radiante e per questo possono essere aggredite chirurgicamente. La metastasectomia completa in paziente con metastasi polmonari invece ha la migliore prognosi di qualsiasi altro paziente in stadio IV con metastasi viscerali (1). L'aggiunta di PET o PET/TC all'imaging convenzionale è stato dimostrato di essere il metodo più sensibile per identificare metastasi nel melanoma in stadio IV. I fattori da tenere in conto per selezionare i pazienti da sottoporre a metastectomia sono vari: la presenza di localizzazione metastatica singola, l'intervallo libero di malattia dalla diagnosi iniziale alla comparsa della malattia sistemica (soprattutto >12 mesi), il tempo di raddoppiamento tumorale (3).

Terapia medica

TERAPIA ADIUVANTE:

Malgrado i pazienti con melanoma allo stadio IIB / C e allo stadio III vengano sottoposti a chirurgia radicale, hanno un alto rischio di ricaduta entro 5 anni il loro trattamento iniziale (39). Per questo motivo con lo scopo di prevenire le recidive o l'insorgenza di metastasi di una neoplasia in seguito ad un intervento terapeutico loco-regionale radicale (chirurgia, radioterapia) viene proposto un trattamento di tipo adiuvante. Sono stati oggetto di studio diversi trattamenti a partire dagli anni 60, il primo tra questi ad essere stato sperimentato è stato il vaccino di BCG, successivamente altre formulazioni sono state indagate ma nessuna di queste ha portato gli effetti sperati e cioè aveva dimostrato di portare un aumento della sopravvivenza globale statisticamente significativo (39). Il primo farmaco che ha dato risultati soddisfacenti è stato approvato dalla FDA nel 1995 ed è l' IFN- α -2b ad alto dosaggio (HDI). Il meccanismo secondo il quale questo farmaco svolge la sua attività antitumorale ancora non è particolarmente chiaro anche se studi su hanno dimostrato che quasi sicuramente agisce

come immunomodulante piuttosto che come agente tossico. Alcuni pathways vengono sottoregolati dall'utilizzo dell'interferone come la via delle MAP chinasi e STAT3 che è un fattore di trascrizione promovente l'angiogenesi e la metastatizzazione. L'utilizzo di IFN in adiuvante è stato oggetto di controversie per quanto riguarda la durata del trattamento, la formulazione da utilizzare (peghilata o meno) e i dosaggi, ma ad oggi alla luce delle terapie disponibili per la terapia adiuvante è diventato obsoleto anche considerando i suoi effetti tossici. A conferma di questo una metanalisi comprendente 14 trial clinici e più di 8000 pazienti ha mostrato un'ottima efficacia dell'interferone sulla RFS (sopravvivenza libera da recidiva) mentre i risultati sulla sopravvivenza globale non erano poi così soddisfacenti considerando anche gli effetti tossici derivanti dal suo utilizzo (39). Può tuttavia essere preso in considerazione in caso di melanoma ulcerato e melanoma allo stadio IIB e IIC in assenza di disponibilità di terapie di nuova generazione (immunoterapie e target therapy). Dal 2011 quindi la terapia adiuvante ha subito una rivoluzione così come il trattamento del melanoma allo stadio IV in quanto il panorama farmacologico è in costante espansione a partire dall'approvazione della FDA di Ipilimumab, a cui rapidamente si sono aggiunti nuovi immunoterapici ma anche anticorpi monoclonali sempre più efficaci (3). Ipilimumab è un anticorpi monoclonali completamente umanizzato contro l'antigene 4 del linfocita T citotossico (CTLA4) che regola l'attività delle cellule T. In tal modo aumenta il numero delle cellule T effettrici reattive che si mobilitano contro le cellule tumorali. Esso quindi va ad aumentare il rapporto intratumorale cellule T effettrici/cellule T regolatrici che conduce alla morte della cellula tumorale. Attualmente ci sono cinque inibitori del checkpoint che sono approvati dalla FDA negli Stati Uniti per il trattamento del melanoma e di altri tumori; questi sono l'Ipilimumab di cui abbiamo parlato sopra, gli inibitori del PD-1 (Nivolumab e Pembrolizumab) e gli inibitori del PDL-1 (Atezolizumab e Avelumab). Di questi, solo gli inibitori CTLA-4 e PD-1 sono approvati dalla FDA per il melanoma e solo l'Ipilimumab è approvato dalla FDA come adiuvante. Lo studio che ha consacrato l'ipilimumab all'utilizzo come terapia adiuvante è stato lo studio randomizzato e controllato EORTC 18071 realizzato in doppio cieco dove sono stati arruolati 951 pazienti con melanoma allo stadio III e in modo randomizzato ad alcuni è stato somministrato Ipilimumab al dosaggio di 10mg/Kg (fase di induzione ogni 3 settimane per 4 cicli seguiti da una dose di mantenimento ogni 12 settimane fino a 3 anni) ad altri un placebo (48). L'endpoint primario di questo studio era valutare la sopravvivenza libera da recidiva mentre endpoint secondari erano la sopravvivenza globale, la sopravvivenza senza metastasi a distanza e la valutazione della qualità della vita. La sopravvivenza senza recidive è stata significativamente più lunga nel gruppo Ipilimumab

rispetto al placebo ed anche la sopravvivenza mediana libera da recidiva nel gruppo Ipilimumab era di 26,1 mesi rispetto con il gruppo placebo a 17,1 mesi, con una sopravvivenza libera da recidiva a 3 anni del 46,5% nel gruppo Ipilimumab, rispetto al 34,8% nel gruppo placebo. Non sono mancati gli effetti avversi dovuti all'utilizzo di questo nuovo farmaco che sono stati per lo più di natura gastroenterica, endocrina ed epatica. Proprio a causa della presenza di questi effetti avversi si sta cercando di trovare una alternativa all'utilizzo di Ipilimumab. A questo proposito sono in corso studi clinici che mettono a confronto l'utilizzo dell'ipilimumab vs nivolumab in terapia adiuvante (48). Nivolumab è un anticorpo monoclonale anch'esso che si lega al recettore programmed death-1 (PD1) e blocca la sua interazione con il PD-L1 ed il PD-L2. Il recettore PD-1 è un regolatore negativo dell'attività delle cellule T che è stato dimostrato essere coinvolto nel controllo delle risposte immunitarie cellulo-mediate. Questo farmaco quindi potenzia le risposte delle cellule T, incluse le risposte anti tumorali attraverso il blocco del legame PD-1/PDL-1, quindi aumenta la capacità del sistema immunitario di sopprimere le cellule tumorali (49). Lo studio in questione è chiamato CHECK 238 è uno studio randomizzato in doppio cieco di fase III in cui sono stati arruolati 906 pazienti, al primo gruppo di pazienti veniva somministrata come terapia adiuvante ipilimumab alla posologia di 10mg/Kg per 4 dosi e poi ogni 12 settimane al secondo gruppo 3mg/kg. (50). L'endpoint primario dello studio era valutare la RFS (Recurrence Free-Survival) a 18 mesi, a 12 mesi è stata del 70,5% e del 60,8% rispettivamente con nivolumab e ipilimumab mentre l'incidenza di effetti avversi è stata del 14,4% nel braccio con Nivolumab e del 45,6% nel braccio con Ipilimumab. I risultati a 36 mesi presentati all'ESMO 2019 hanno ancora una volta rafforzato la superiorità del nivolumab con una RFS del 58% contro quella dell'ipilimumab del 45%. Ad oggi non sono ancora disponibili i risultati sull'OS (overall survival). Anche il report di un sottogruppo giapponese che ha partecipato allo studio CHECK 238 nivolumab ha dimostrato avere RFS e DMFS più lunghi rispetto a ipilimumab, infatti tra i pazienti giapponesi i tassi di RFS a 12 mesi erano 56% e 30% e 12-i tassi di DMFS mensili erano del 67% e del 50% con nivolumab e ipilimumab, rispettivamente. Inoltre Nivolumab è stato tollerato meglio di ipilimumab, con un valore inferiore di effetti collaterali (51). Un altro PD-1 inibitore è stato ed è tuttora oggetto di studio per un suo possibile utilizzo in terapia adiuvante al posto dell'Ipilimumab, il pembrolizumab che è molto simile al Nivolumab sia come farmacodinamica che come effetti collaterali. Il pembrolizumab è stato coinvolto in vari studi come "EORTC 1325 / KEYNOTE-054" che è un trial di fase III comprendente 1019 pazienti che ha confrontato la somministrazione di Pembrolizumab al dosaggio 200 mg ogni 3 settimane per un anno vs una

sostanza placebo (52). A 1,25 anni (2018) lo studio ha dimostrato una riduzione del 43% di rischio di recidiva o di morte nel paziente a cui veniva somministrato pembrolizumab. Questi risultati hanno portato L'EMA (2018) e l'FDA (2019) ad utilizzare il farmaco in pazienti in stadio III ad alto rischio. Lo studio poi è continuato con endpoint secondari come sopravvivenza priva di metastasi e sopravvivenza globale (OS). Gli eventi avversi immunocorrelati relativamente frequenti in associazione con pembrolizumab erano ipotiroidismo (14,3%) e ipertiroidismo (10,2%), polmonite (3,3%) e sarcoidosi (1,4%), con la maggior parte degli eventi di grado 1 o 2. L'incidenza di eventi avversi immuno-correlati di grado 3 o 4 era bassa (7,1%) e la maggior parte degli eventi si sono risolti entro 2 mesi dall'ultima dose di pembrolizumab (52). Alla luce di queste evidenze l'utilizzo degli anti PD-1 come adiuvante in pazienti sottoposti a exeresi chirurgica allo stadio III ed ad alto rischio di recidiva è considerato il nuovo standard di cura per i pazienti con melanoma wild-type BRAF (46). In caso di melanoma BRAF mutati che riguarda circa il 50% dei pazienti con melanoma invece le armi terapeutiche sono ben altre, ci si avvale infatti dell'utilizzo della target therapy, in particolare i farmaci approvati sono vemurafenib (inibitore di BRAF), dabrafenib (inibitore di BRAF), trametinib (inibitore di MEK1 e MEK2) e cobimetinib (inibitore di MEK) (53). Questi farmaci sono stati oggetto di studio e protagonisti di diversi trial clinici che hanno sottolineato la loro importanza nel trattamento di melanomi BRAF mutati. BRIM-8 e COMBI-AD sono i primi due studi realizzati sull'utilizzo della terapia adiuvante per il melanoma mutato da BRAF (46). Lo studio BRIM-8, studio randomizzato, in doppio cieco ha coinvolto 498 pazienti dallo stadio IIC allo stadio IIC ha confrontato vemurafenib in terapia adiuvante somministrato al dosaggio di 960mg/2 volte al giorno per 1 anno vs placebo. L'endpoint primario dello studio era valutare la sopravvivenza libera da malattia che è stata valutata separatamente in due coorti (IIC-IIIA-IIIB) e IIIC. Nello studio l'endpoint primario non è stato raggiunto per questo non è consigliabile l'utilizzo in monoterapia del solo vemurafenib per la terapia adiuvante (53). È stato realizzato un secondo studio COMBI-AD randomizzato di fase III in cui sono stati arruolati 870 pazienti di cui 792 (91%) avevano la mutazione BRAF V600E e 78 (9%) quella di BRAF V600K. I partecipanti allo studio sono stati quindi stratificati quindi sia per la diversa mutazione sia per lo stadi di malattia (IIIA, IIIB, o IIIC) e sono stati assegnati random o al gruppo a cui veniva somministrato dabrafenib (150mgx2 die) + trametinib (2mg/die) per 12 mesi o al gruppo placebo. Dopo un follow-up minimo di 2,5 anni l'endpoint primario dello studio, l'RFS a 3 anni è stata del 58% vs 39% nel braccio in trattamento vs placebo. L'overall survival (OS) stimata sempre a 3 anni era dell'86 vs 77% a favore del trattamento terapeutico (54). Il trattamento adiuvante combinato

con dabrafenib / trametinib può quindi essere considerato come una valida opzione terapeutica adiuvante per i pazienti con melanoma in stadio III con mutazione di BRAF. Per il melanoma mutato da BRAF, poiché non esiste uno studio che metta in diretto confronto dabrafenib / trametinib rispetto a gli inibitori di PD-1, le decisioni terapeutiche individuali dovrebbero essere prese con il paziente, tenendo conto dei profili di tossicità (46).

In alternativa alle opzioni terapeutiche qui sopra riportate, sono state esplorate terapie vaccinali adiuvanti. Diverse strategie di vaccino contro il melanoma sono attualmente allo studio (3). I vaccini contro il melanoma possono essere classificati in base al tipo di antigene associato al tumore coinvolto: cellule tumorali intere, lisati tumorali, peptidi, filamenti di DNA / RNA e cellule dendritiche stimulate utilizzate per la presentazione dell'antigene. Vi è un maggiore interesse nel prendere di mira i neoantigeni che riflettono le mutazioni somatiche nei geni espressi in modo univoco nelle cellule di melanoma (neoantigeni mutati). Queste strategie antigeniche da sole generalmente non sono sufficienti per provocare una risposta immunitaria forte e prolungata e quindi sono solitamente combinati con "adiuvanti vaccinali". Gli adiuvanti vaccinali hanno lo scopo di produrre una risposta immunitaria più vigorosa aumentando l'assorbimento e la presentazione dell'antigene, reclutando altre cellule immunitarie, promuovendo il trasporto dell'antigene ai linfonodi e formando un effetto deposito per il rilascio prolungato dell'antigene nel sito di iniezione. Un esempio di un vaccino contro il melanoma che ha mostrato risultati promettenti negli studi clinici su pazienti con melanoma è il vaccino 6-MHP (6-Melanoma Helper Peptide) (39). Questo vaccino ha indotto risposte dei linfociti T helper CD4 in oltre l'80% dei pazienti e risposte cliniche durature o un controllo prolungato del tumore in oltre il 20% dei pazienti. Una migliore sopravvivenza è stata osservata anche nei pazienti con melanoma in stadio III e IV quando sono state rilevate risposte precoci di cellule T specifiche per il vaccino e/o anticorpi. Un importante passo avanti nello sviluppo di vaccini per i pazienti con melanoma in stadio III e IV è descritto in due recenti articoli pubblicati nello stesso numero di Nature nel 2017. Entrambi gli studi hanno dimostrato che i loro neoantigeni predetti consentivano un mezzo efficace di efficacia immunologica e terapeutica contro il melanoma in stadio III dopo resezione chirurgica durante il breve periodo di follow-up di 12-25 mesi. Questo metodo di vaccini neoantigeni personalizzati necessita ancora di indagini per garantirne la sicurezza e l'efficacia in quanto richiede una notevole quantità di tempo e risorse. Anche la proteina MAGE-A3 è un ottimo bersaglio per un possibile vaccino contro il melanoma in quanto si esprime in pochissimi tessuti sani, ma è espresso abbastanza comunemente nel tumore fino ad essere presente nel 76% dei melanomi. Piccoli studi preliminari hanno mostrato che il vaccino

MAGE-A3 è particolarmente immunogenico e capace di indurre antitumorale in più tumori maligni compreso il melanoma. Una piccola sperimentazione di fase II ha tentato di identificare il miglior immunoadiuvante per accompagnare MAGE-A3 nei pazienti con melanoma (3). Uno studio di fase III (lo studio DERMA) è stato avviato per confrontare l'efficacia del vaccino vs il placebo. Lo studio aveva arruolato 1351 pazienti con melanoma in stadio IIIB-C ma è stato interrotto all'inizio della valutazione degli endpoint primari in quanto si è rivelato una mancanza di efficacia nel gruppo del vaccino rispetto al placebo (53).

La biochemioterapia è un'opzione alternativa per i pazienti allo stadio III di malattia ad alto rischio. La biochemioterapia è definita come qualsiasi regime che include sia la chemioterapia (singola o combinata) e immunoterapia, tipicamente IFN α e / o IL-2 (39). L'uso adiuvante della biochemioterapia è stato valutato in uno studio SWOG S0008 randomizzato di fase III. In questo studio sono stati arruolati 432 pazienti ad alto rischio con melanoma resecato allo stadio IIIa-IIIb- IIIc e sono stati assegnati in modo casuale a ricevere 3 cicli di chemioterapia adiuvante comprendente cisplatino, vinblastina, dacarbazina, IL-2 e IFN α ogni 21 giorni, o solo IFN α ad alte dosi. Lo studio ha avuto un follow-up mediano di 7,2 anni, mostrando un RFS migliorato di 4 contro 1,9 anni, rispettivamente nei gruppi BCT e IFN. Tuttavia l'altro endpoint co-primario l'overall survival (OS) non ha mostrato alcun statisticamente significativa differenza. La tossicità di grado 3 o superiore era osservato più frequentemente nel gruppo BCT (76 vs 64%), e le tossicità più comunemente rilevate erano di tipo ematologico (leucopenia, neutropenia o trombocitopenia), gastrointestinale, metabolica (ipocalcemia) e ipotensione (55). Pertanto, sembra che la biochemioterapia sia una terapia adiuvante alternativa potenzialmente utilizzabile ma con una potenziale tossicità da non sottovalutare.

Il ruolo della radioterapia nei pazienti dopo l'asportazione chirurgica per il melanoma cutaneo è molteplice solitamente la radioterapia viene somministrata ai pazienti che hanno subito chirurgia con ampia escissione locale e hanno un alto rischio di incorrere in una ricorrenza locale o regionale come ad esempio in caso di margini di resezione inadeguati, in caso di resezioni R1 (tumore microscopico al margine) o dopo la resezione di malattia voluminosa. Attualmente la radioterapia adiuvante sul sito di melanoma primario non è considerato lo standard di cura per un paziente a medio rischio; Tuttavia, svolge un ruolo importante nella gestione dei pazienti con melanoma neurotropi desmoplastici così come i pazienti con melanomi della regione testa-collo (3). L'idea di utilizzare la radioterapia come terapia adiuvante risale agli anni '50 e da lì in poi numerosi studi hanno confermato l'importanza e l'efficacia del trattamento radioterapico nel controllo locale della neoplasia post chirurgia

escissionale. Uno studio prospettico randomizzato ha dimostrato che l'irradiazione adiuvante dopo dissezione linfonodale riduce del 50% il rischio di ricaduta ma non ha alcun impatto sulla sopravvivenza libera da recidiva (RFS) e in generale sulla sopravvivenza (OS). Proprio per questo motivo la radioterapia adiuvante non può essere consigliato nel setting routinario ma solo in determinate occasioni come identificate sopra (3).

Terapia medica del melanoma metastatico o inoperabile

Il trattamento della malattia metastatica fino a poco tempo fa era un trattamento per lo più a scopo palliativo in quanto i farmaci a disposizione, i chemioterapici, non erano in grado di assicurare un potere curativo ed un effetto alquanto limitato. Ad oggi invece con l'avanzare delle target therapy in particolare gli inibitori di BRAF e MEK, dell'ipilimumab e degli inibitori di PD-1 si sono osservati notevoli miglioramenti per quanto riguarda la sopravvivenza (3). Pazienti con malattia metastatica avevano una sopravvivenza media di 6-9 mesi dopo la diagnosi con un tasso di sopravvivenza a 5 anni inferiore al 5%. Prima dell'avvento dei nuovi farmaci in passato non vi era uno standard terapeutico per pazienti con melanoma al IV stadio e per questo erano utilizzate alte dosi di IL-2 e TNF α . Nei pazienti che non tolleravano questo trattamento venivano utilizzati i chemioterapici citotossici come la dacarbazina e la temozolomide (3). Questi vengono tuttora utilizzati in pazienti che non possono usufruire della target therapy o come terza linea in caso di tumore BRAF mutato. Tra gli altri agenti chemioterapici utilizzati abbiamo il platino, gli alcaloidi della vinca, i tassani e le nitrosuree anche se questi hanno dimostrato apportare un minimo benefici clinico dimostrando di causare una risposta inferiore al 20%. Tra questi la Dacarbazina è quella che si è distinta maggiormente ed è considerato il farmaco chemioterapico maggiormente attivo contro il melanoma metastatico con un tasso di risposta media dell'8-20%. Anche se non è stato condotto nessun trial che paragonasse la dacarbazina vs placebo in termini di aumentata sopravvivenza, è stata approvata dall'FDA come terapia per il melanoma metastatico (39). Il secondo chemioterapico utilizzato è la temozolomide che è in realtà un analogo triazenico della dacarbazina ma che a differenza di questa riesce a penetrare la barriera ematoencefalica. È stato condotto uno studio clinico di fase III che ha coinvolto 305 pazienti in cui l'obiettivo era valutare se ci fossero differenze in termini di sopravvivenza tra il trattamento con temozolomide vs il trattamento con dacarbazina. Questo ha dimostrato che non vi era una differenza significativa in termini di sopravvivenza globale (7.7 mesi vs 6.4 mesi rispettivamente) così come non vi era differenza statisticamente significativa per quanto riguarda la sopravvivenza libera da progressione di malattia (1.9 mesi vs 1.5 mesi

rispettivamente) (39). Un secondo studio, EORTC, ha trovato la stessa mancanza di differenza significativa in termini di sopravvivenza tra l'utilizzo di temozolomide e dacarbazina (9,1 mesi vs 9,4 mesi). La seconda classe di chemioterapici che hanno dimostrato di avere un tasso di risposta intorno al 13-18% sono le nitrosuree tra cui ricordiamo la fotemustina e la carmustina. In questo caso è stato realizzato uno studio clinico confrontando queste due classi di chemioterapici in particolare la fotemustina vs la dacarbazina. Questo studio di fase III ha dimostrato la superiorità del tasso di risposta della fotemustina (15,2%) rispetto a quello ottenuto somministrando dacarbazina (6,8%) ma non ha rilevato una statisticamente significativa differenza in termini di tempo di progressione e sopravvivenza globale. Gli effetti collaterali riscontrati a causa dell'utilizzo della fotemustina però erano notevolmente più gravi rispetto a quelli causati dalla dacarbazina (39). Da sottolineare il fatto che anche la fotemustina è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica quindi può essere d'aiuto nei pazienti con localizzazioni cerebrali di malattia. Anche il paclitaxel è stato protagonista di uno studio clinico di fase III che coinvolgeva 529 pazienti con melanoma metastatico paragonandolo alla dacarbazina. I risultati dimostrarono un miglioramento significativo per quanto riguarda l'endpoint primario dello studio che era la PFS (sopravvivenza libera da progressione) (4.8 mesi vs 2.5 mesi) ma la differenza in termini di sopravvivenza globale non era altrettanto significativa. In alternativa all'utilizzo singolo di questi chemioterapici si è pensato di somministrarli assieme all'IL-2 e TNF α ma lo studio svolto con questo obiettivo ha dimostrato non esserci nessuna evidenza a somministrare questa associazione. Si è anche pensato di combinare il paclitaxel e il carboplatino con il sorafenib e a questo riguardo è stato realizzato lo studio PRISM che metteva a confronto l'utilizzo di questi tre farmaci combinati con la sola combinazione di paclitaxel e carboplatino. L'aggiunta del sorafenib non è risultato apportare nessun vantaggio di sopravvivenza (46). Invece lo studio BEAM ha indagato l'utilizzo del carboplatino e paclitaxel combinati con il bevacizumab (anti VEGF); questo studio a cui hanno preso parte 214 pazienti con melanoma metastatico non trattato ha dimostrato che dopo 13 mesi la PFS era rispettivamente nel gruppo con o senza bevacizumab di 5,6 mesi vs 4,2 mesi e la OS (overall survival) di 12,3 vs 8,6 mesi. Inoltre il trattamento polichemioterapico non ha dimostrato benefici rispetto al trattamento monochemioterapico in termini di sopravvivenza. Si è pensato quindi di abbinare al regime polichemioterapico classico (CVD) il trattamento immunoterapico con INF α e IL-2 ma i vari studi di fase III che sono stati realizzati hanno evidenziato un non miglioramento in termini di sopravvivenza ma anzi gli effetti collaterali causati dall'associazione erano notevoli. Quindi ad oggi le opzioni terapeutiche utilizzate nel trattamento del melanoma metastatico con chemioterapici

comprendono l'utilizzo di dacarbazina, temozolomide e fotemustina, solo in casi eccezionali regimi polichemioterapici o biochemioterapici (39).

Per quanto riguarda il trattamento immunoterapico il primo trattamento provato è stato quello con IL-2 ad alto dosaggio per via endovenosa; questa induceva un tasso di risposte complete nel 6-7% dei pazienti a fronte però di una tossicità importante rappresentata dalla sindrome da iperpermeabilità capillare con conseguente edema polmonare, insufficienza renale. Per questa motivazione il trattamento non è stato approvato dall'EMA, mentre l'FDA lo ha approvato nel 1998. La vera rivoluzione nel trattamento immunoterapico del melanoma metastatico si è avuto con l'introduzione degli inibitori del checkpoint, primo tra questi l'ipilimumab, anticorpo monoclonale contro il recettore CTLA4 che si trova sulla superficie dei linfociti T. Normalmente infatti questo recettore interagendo con il suo ligando CD86 genera un segnale inibitorio causando uno stato di anergia linfocitaria e diminuendo in questo modo la risposta immunitaria nei confronti del tumore. L'ipilimumab invece inibendo questo segnale fa sì che questo non accada incrementando in questo modo la risposta del sistema immunitario contro le cellule neoplastiche. Le potenzialità di questo farmaco si sono rese evidenti a seguito della realizzazione di uno studio randomizzato multicentrico effettuato in 13 nazioni tra il 2004 e il 2008 in cui venivano confrontati 3 trattamenti diversi coinvolgente 676 pazienti. Le tre associazioni terapeutiche che venivano messe a confronto erano ipilimumab + vaccino peptidico (403 pazienti), ipilimumab + placebo (137 pazienti) e vaccino peptidico (gp100)+placebo (136 pazienti) (3). Questo è stato lo studio che ha portato alla registrazione dell'ipilimumab in quanto i risultati ottenuti erano particolarmente positivi infatti i pazienti del gruppo ipilimumab+gp100 avevano una sopravvivenza media di 21 mesi circa, quelli trattati con il solo ipilimumab di 27,8 mesi e quelli nel gruppo placebo/gp100 di 17,2 mesi. Anche i tassi di sopravvivenza globale mostrarono un significativo miglioramento con l'utilizzo del solo ipilimumab con una sopravvivenza del 45,6% a 12 mesi, del 33% a 18 mesi e del 23,5% a 24 mesi a confronto della sopravvivenza nel gruppo placebo che è stata del 25,3% a 12 mesi, del 16,3% a 18 mesi e del 13,7% a 24 mesi. (3) Tra gli effetti collaterali registrati hanno grande rilievo quelli immunorelati che hanno interessato il 60% dei pazienti a cui era stato somministrato ipilimumab; i due più importanti sono stati la dermatite e la diarrea potenzialmente fatale in quanto comporta rischio di perforazione se non trattata. È stato oggetto di studio anche la combinazione dell'ipilimumab con la dacarbazina vs la sola dacarbazina in pazienti con melanoma metastatico e anche questa volta l'ipilimumab ha dimostrato la sua efficacia in quanto la sua aggiunta al trattamento ha portato una sopravvivenza di 11,2 mesi vs 9,1 mesi. Ipilimumab quindi è indicato per il trattamento dei

pazienti affetta da melanoma in stato avanzato al dosaggio di 3mg/kg ogni 3 settimane in 4 somministrazioni anche se l'avvento degli anti PD-1 i quali sono superiori in termini di sicurezza ed efficacia lo ha fatto passare in secondo piano.

A questo proposito è da citare lo studio “Checkmate 067” di superiorità di fase III i cui endpoints primari erano la OS e la PFR confrontando nivolumab+ ipilimumab vs ipilimumab vs nivolumab in 945 pazienti (56). Ricordiamo che Nivolumab è, così come il pembrolizumab, un anti PD-1 quindi modula la risposta immunitaria dell'organismo nei confronti del tumore. Tornando allo studio questo è stato il primo ad abbinare un anti CTLA4 con un anti PD1 e i risultati sono stati sorprendenti. Infatti l'associazione ipilimumab+ nivolumab a 5 anni dall'inizio dello studio non ha ancora raggiunto l'overall survival mediana che ha ormai superato i 60 mesi mentre questa è risultata di 36,9 mesi nel braccio trattato con il solo nivolumab e 19,9 mesi in quello trattato con il solo ipilimumab mentre i pazienti che dopo 5 anni sono ancora in vita sono rispettivamente il 52%, il 44% e il 26% (56). Il secondo studio cardine è lo studio “KEYNOTE-006” comprendente 834 pazienti con melanoma in stadio avanzato che ha valutato il trattamento con pembrolizumab 10 mg/kg vs ipilimumab (4 cicli). Il pembrolizumab a 33 mesi ha dimostrato una OS del 50% nel braccio con pembrolizumab contro una OS del 39% nel braccio con ipilimumab e ad un follow-up mediano di 9 mesi i pazienti trattati con pembrolizumab erano vivi nel 98% (57). Alla luce di questi risultati è facile dedurre che gli anti PD-1 hanno un beneficio di sopravvivenza e di tollerabilità maggiore tanto da poterli preferire o al massimo associare all'ipilimumab e per questo nivolumab o nivolumab + ipilimumab sono indicati come terapie di prima linea nel trattamento del melanoma avanzato o metastatico secondo le linee guida ESMO 2019 (46). Per individuare i pazienti che beneficerebbero maggiormente dell'associazione dei due farmaci andrebbero valutati alcuni parametri clinici o biochimici come la presenza di metastasi cerebrali o un elevato livello di LDH somministrando l'associazione nivolumab + ipilimumab a quei pazienti con un LDH 2 volte maggiore rispetto al valore normale.

Tutto questo detto finora va ritenuto vero per i melanomi con BRAF wild type mentre per i melanomi mutati abbiamo un ampio panorama di altri farmaci da poter utilizzare in base alla mutazione riscontrata. In caso infatti di melanoma metastatico o in fase avanzata va sempre valutato lo stato mutazionale di BRAF, NRAS e C-KIT per stabilire se potersi avvalere della target therapy o meno (3). In caso di melanoma avanzato con mutazione di BRAF V600 la prima linea di trattamento comprende l'associazione di un BRAF inibitore e di un MEK inibitore. Il vantaggio in termini di sopravvivenza dell'associazione piuttosto che del trattamento singolo con inibitore di BRAF è stata valutata dallo studio COMBI-d che ha

confrontato il trattamento con dabrafenib (anti BRAF)+trametinib (anti MEK1-2) vs dabrafenib in 423 pazienti con BRAF V600E/K. Il trattamento di combinazione si è dimostrato superiore in tutti e tre endpoints primari come la PFS, l'OS e l'RR con una OS a 3 anni del 44% rispetto al 32% del solo dabrafenib (58). Un secondo studio "CO-BRIM" ha valutato in 495 pazienti con melanoma al IIIC o al IV stadio la combinazione verumafenib + cobimetinib vs verumafenib da solo. Anche in questo caso l'associazione si è rivelata essere maggiormente efficace in termini di OS e PFS (59). Secondo le linee guida dell'ESMO 2019 questo trattamento combinato è consigliabile come prima linea nel trattamento del melanoma non resecabile o metastatico con mutazione di V600 E (46). Un'altra associazione è stata testata ovvero il trattamento combinato binimetinib + encorafenib confrontata sia vs verumafenib sia vs il solo encorafenib nello studio "COLUMBUS". I risultati di questo studio randomizzato di fase III hanno evidenziato non solo la superiorità dell'associazione nei confronti del verumafenib ma anche nei confronti dell'encorafenib evidenziando una PFS di 14,9 mesi nel braccio a cui era stata somministrata l'associazione a dispetto dei 7.3 mesi del braccio trattato con verumafenib (60). Anche questa viene consigliata dall'ESMO 2019 come possibile linea terapeutica da utilizzare nei pazienti con melanoma non resecabile. In generale l'indicazione data quindi è quella di utilizzare sempre l'associazione BRAF/MEK inibitori a dispetto del singolo BRAF inibitore che può essere utilizzato solo in caso di controindicazioni assolute all'uso del MEK inibitore (46). Di prima linea sono quindi sia i BRAF/MEK inibitori che gli immunoterapici, e due studi stanno valutando quando e se sia meglio utilizzare l'uno piuttosto che l'altro e sono gli studi "SECOMBIT" e "NCT02631447" che sono volti a valutare la combinazione migliore tra questi trattamenti in termini di OS (46). Le meta-analisi evidenziano che sebbene la target therapy riveli un miglioramento nei primi 12 mesi di terapia, con l'immunoterapia si ha una migliore sopravvivenza dopo 1 anno. Quindi l'indicazione data dall'ESMO 2019 è di utilizzare come prima linea terapeutica nei pazienti con tumori non a rapida progressione o che non coinvolgono organi importanti o vitali l'immunoterapia in modo da preservare l'utilizzo della target therapy in caso di progressione della malattia (46).

Per quanto riguarda la target therapy in caso di melanoma N-RAS mutato gli studi e quindi anche i farmaci consigliati sono nettamente inferiori. È stato realizzato lo studio NEMO in cui è stata valutata l'efficacia del trattamento con binimetinib vs dacarbazina in pazienti con N-RAS mutato, non trattati o trattati con immunoterapia ma in progressione. I risultati hanno evidenziato una netta superiorità del trattamento con binimetinib soprattutto nel braccio con pazienti pretrattati con immunoterapia (PFS 5,5 mesi) (61). Quindi la prima linea terapeutica

da seguire in caso di melanomi N-RAS mutati è la stessa dei melanomi WT e quindi immunoterapia, poi in caso di progressione si procede con la target therapy. Nei melanomi con mutazione di c-KIT che si riscontra in modo particolare nelle neoplasie insorti a livello degli arti e in zone cronicamente esposte al sole l'uso dell'imatinib e del nilotinib (c-KIT inibitori) è alquanto limitato e vanno presi in considerazione come seconda linea terapeutica mentre in prima battuta è consigliabile trattarli allo stesso modo dei melanomi WT (46). Le seconde linee di trattamento solitamente dipendono dal trattamento utilizzato in prima battuta quindi differiscono in base allo status mutazionale della neoplasia. Per i melanomi WT se in prima linea sono stati utilizzati i PD-1 inibitori in seconda linea si consiglia di aggiungere l'ipilimumab e in alcuni casi la chemioterapia con temozolomide può essere considerata come terapia ponte. Nel caso dei melanomi BRAF mutati gli inibitori BRAF/MEK possono essere utilizzati in seconda battuta in caso non siano stati utilizzati in prima linea anche se si dovrebbe aspettare troppo nel ricorrere a questi soprattutto nel caso in cui i parametri clinici come i livelli di LDH, il numero delle metastasi e l'ECOG PS siano diventati dei marker prognostici negativi. Non ci sono evidenze scientifiche su cui basare le linee successive di terapia, potrebbe essere un'opzione da tenere in conto inserire i pazienti in trial clinici oppure riprovare con immunoterapia o target therapy. L'ultima spiaggia è il ricorrere all'utilizzo della chemioterapia con temozolomide o DTIC come trattamento palliativo (46).

Una trattazione a parte merita il trattamento delle metastasi cerebrali le quali spesso comportano un outcome sfavorevole per il paziente affetto da melanoma metastatico. In base alle necessità individuali possono essere individuati 4 trattamenti possibili: trattamento neurochirurgico per l'asportazione la radiocirurgia stereotassica la target therapy con BRAFi/MEKi e l'immunoterapia. La scelta del trattamento si basa solitamente sul numero di metastasi, sulla grandezza e sede del tumore primario, sul performance status di Karnofsky e sulla presenza o meno di malattia extracranica. L'irradiazione cerebrale in toto al dosaggio di 30Gy in 10 frazioni o 20Gy in 5 frazioni andrebbe evitata quando possibile per la mancanza di efficacia e la tossicità a lungo termine ma trova indicazione in caso di pazienti con localizzazioni cerebrali multiple e metastasi leptomeningee per le quali è sconsigliata la chirurgia stereotassica o la resezione. La tossicità provocata porta ad un declino neurocognitivo che porta ad uno stato assimilabile alla demenza; siccome il danno sembra essere provocato da una irradiazione dell'ippocampo la radioterapia con risparmio dell'ippocampo sembra essere una buona alternativa. Questa metodica è stata valutata dallo studio "RTGO 0933" in cui sono stati trattati 113 pazienti con metastasi cerebrali prendendo come controllo un dato storico di pazienti trattati con irraggiamento anche dell'ippocampo

(62). I risultati hanno confermato una riduzione importante del declino cognitivo valutando i pazienti con il “ Hopkins Verbal Learning Test Revised Delayed Recall” a 4 mesi (7% a confronto dell’30% che sono andati in contro a declino neurocognitivo)

La radioterapia stereotassica invece permette di erogare dosi elevata sulle lesioni target e di risparmiare invece i tessuti sani. Questa comporta un buon controllo locale (85%) e una sopravvivenza mediana di 5-11 mesi. Gli studi realizzati paragonandola con la radioterapia panencefalica hanno dimostrato la sua superiorità in termini di controllo locale dell’estensione metastatica e di minori effetti collaterali. Nei pazienti con un basso numero di metastasi (<5-10) peraltro asintomatiche e lesioni di dimensioni inferiori ai 3 cm la radioterapia stereotassica dovrebbe essere presa come trattamento primario. Per i pazienti nei quali il trattamento sistemico non ha avuto il risultato sperato, questo trattamento potrebbe essere considerato come una terapia di salvataggio se le localizzazioni metastatiche rispecchiano i criteri di cui sopra. Per quanto riguarda la terapia sistemica in caso di pazienti con melanoma metastatico con mutazione di BRAF può essere preso in considerazione il trattamento con target therapy come evidenziato dallo studio “COMBI-MB” che ha evidenziato che la risposta delle localizzazioni metastatiche intracraniche da melanoma BRAF V600 mutato sono migliori se trattate con la terapia combinata di dabrafenib e trametinib comprendola con il trattamento del solo BRAF inibitore (63). Anche l’immunoterapia con anti PD1 in monoterapia oppure ipilimumab + nivolumab è stata studiata per il trattamento delle metastasi cerebrali. I risultati degli studi suggeriscono che la combinazione dei due farmaci ha un PFS maggiore del 50% a 18 mesi con un tasso di risposta globale del 46% in pazienti con localizzazioni cerebrali asintomatiche. I risultati hanno evidenziato che la combinazione ipilimumab+ nivolumab è preferire come trattamento di prima battuta anche nei pazienti con metastasi cerebrali da melanoma BRAF mutato(64).

Valutazione della risposta al trattamento:

L’oncologo deve sia durante il trattamento adiuvante che durante la fase di terapia avanzata valutare la risposta alla terapia messa in atto, valutando sia l’impatto della terapia sulla malattia quindi la diminuzione in termini di dimensioni della lesione, il cosiddetto “tumour shrinkage”, ma anche la durata di tale risposta la quale potrebbe essere solo di qualche settimana/mese. Per essere globale la valutazione deve comprendere anche l’impatto che ha la terapia sulla qualità di vita del paziente e se porta o meno ad un aumento della sopravvivenza. Per valutare oggettivamente la riduzione del volume tumorale ci si avvale dei criteri RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumor) di cui è stata pubblicata la versione 1.1 nel 2009. Questi

erano stati pubblicati per la prima volta nel 2000 andando a sostituire i criteri WHO che erano stati pubblicati nel 1981. Prima di tutto è necessario accertarsi di poter applicare i criteri RECIST alle lesioni in base al fatto che queste siano misurabili o meno. Vengono considerate misurabili infatti le lesioni che possono essere accuratamente misurate in almeno una dimensione che abbiano una dimensione minima alla TC di 10 mm, oppure all'esame clinico di 10 mm (ad esempio nel caso del melanoma si consiglia di fotografarlo e misurarlo con un righello o un tumorimetro) o all'RX torace di 20 mm. Nel caso di linfonodi questi per essere considerati potenzialmente patologici e misurati devono avere un asse corto di almeno 15 mm allo studio TC (65). Al contrario se queste dimensioni non vengono raggiunte alle lesioni non possono essere applicati i criteri e per questo motivo non vengono classificate come non misurabili. Un'altra distinzione va fatta tra lesioni target e lesioni non target. Le lesioni target sono considerate tutte quelle lesioni misurabili per un massimo di 2 lesioni per organo e 5 lesioni in totale. Le altre lesioni vengono considerate non target, non vengono misurate e dovrebbe essere descritto solo se nel tempo sono presenti, assenti o in progressione. I criteri si applicano individuando alla TC le 5 lesioni target rappresentative del tumore e andando a sommarne i diametri ed in seguito si monitora la somma totale dei diametri nel tempo mediante TC dopo i cicli di chemioterapia. Dopo un ciclo intero di CHT, la TC può mostrare:

- **Risposta completa (RC):** se si osserva la scomparsa delle lesioni target per 4 settimane, questo ovviamente non vuol dire che il paziente è guarito: occorre il mantenimento di questa risposta con il follow-up
- **Risposta parziale (PR):** se si osserva una diminuzione maggiore del 30% della somma dei diametri delle lesioni target
- **Progressione di malattia(PD):** se si osserva un aumento maggiore del 20% della somma dei diametri delle lesioni target, o la comparsa di nuove lesioni
- **Stabilità di malattia (SD):** se si osserva una riduzione o aumento della somma dei diametri che non rientra nelle categorie PD o PR; è un'area grigia il cui valore prognostico

- dipende dall'aggressività di malattia.

Le lesioni non target invece vengono valutate in modo diverso: si può avere:

- **Risposta completa (CR):** Scomparsa di tutte le lesioni non target e la normalizzazione dei livelli dei marker tumorali.
- **Risposta incompleta o malattia stabile (SD):** si ha la persistenza della presenza di una o più lesioni non target e i livelli dei marker tumorali continuano ad essere elevati.
- **Progressione di malattia (PD):** si ha la comparsa di una o più nuove lesioni e/o l'aumento inequivocabile delle lesioni già preesistenti (66).

È da sottolineare che con la nuova versione dei criteri RECIST (1.1) sono cambiati i criteri linfonodali: un tempo si considerava normale un linfonodo il cui diametro maggiore era fino a 1 cm oggi in oncologia si guarda il diametro minore che può essere anche leggermente superiore di 1 cm la comparsa di nuove lesioni deve essere inequivocabile quindi non attribuibile a differenze nelle tecniche di studio o a lesioni non tumorali. Se dubbie l'oncologo continua il trattamento fino a rivalutazione successiva, a parità di trattamento, a volte il farmaco non agisce tanto sulla dimensione ma induce ischemia e morte e la lesione resta uguale: in questo caso c'è una risposta morfologica e non dimensionale, e per alcuni farmaci serve molto di più una valutazione morfologica di quella dimensionale (risposte sopra > RECIST) (67). Questo aspetto è valido soprattutto per i farmaci biologici, che a differenza dei farmaci citotossici hanno un effetto soprattutto citostatico e in cui l'indicatore di attività del farmaco è la stabilizzazione di malattia; addirittura per questi farmaci la progressione di malattia non necessariamente è segno di inattività del farmaco. Questo può comportare una sottostima teorica dell'attività di farmaci biologici e il rifiuto di farmaci potenzialmente efficaci; occorre pertanto fare riferimento per questi farmaci non solo a criteri diagnostico strumentali, ma anche a:

- **criteri clinici:** come EO, performance status, sintomi tumore-correlati, perdita di peso, consumo di analgesici, qualità di vita del paziente
- **criteri di laboratorio:** emocromo, funzionalità epatica e renale, LDH, calcemia, marker.

Nel dubbio, a differenza della chemioterapia classica in cui se siamo nel dubbio ci si ferma e si cambia strategia, con i farmaci biologici se c'è un beneficio clinico, si può continuare fino a una nuova rivalutazione successiva. Quindi è sempre più importante valutare il beneficio clinico non solo quello strumentale. Inoltre è necessario valutare le lesioni non solo rispetto all'imaging precedente ma anche rispetto al nadir ovvero se si parte con un nodulo di 3cm, che

dopo un po' di terapia si riduce a 1cm, questo significa che ha un'ottima risposta parziale perché c'è una riduzione del 67% poi però questo nodulo aumenta di 3mm: siamo ben al di sotto dei valori di partenza, ma ai sensi dei criteri RECIST, questo è già un aumento del 30% e quindi una progressione. Quindi nei criteri di valutazione della risposta all'interno di studi clinici, ovvero i criteri RECIST, un aumento della lesione va valutato rispetto al nadir, cioè al momento della maggiore riduzione.

Un altro sistema di valutazione della risposta è una valutazione di tipo metabolico, mediante PET/TC, e si basa sulla captazione di un tracciante: il 18 fluorodesossiglucosio: una diminuzione del 20% della captazione di FDG espressa come SUV (standardized uptake value), anche a parità di massa tumorale, è indicativo di risposta. I criteri RECIST però non sempre possono essere applicati, questo è il caso dell'immunoterapia in cui la risposta del tumore alla terapia è ben diversa rispetto alla risposta che si ottiene dopo chemioterapia. Inizialmente infatti valutando le curve di sopravvivenza dei pazienti trattati con immunoterapia all'inizio non sembra esserci una diminuzione della massa tumorale ma anzi si osserva quella che viene definita una pseudo-progressione che viene però seguita poi dalla risposta vera e propria. La causa di questa pseudo-progressione non è ancora del tutto chiara ma sono state avanzate varie ipotesi: potrebbe essere causata da una elevata infiltrazione nel di linfociti T citotossici, oppure potrebbe essere causata da un aumento massivo del microambiente infiammatorio o ancora il tumore ha una crescita talmente rapida che aumenta di dimensioni prima che il trattamento faccia effetto. Per questa particolarità è stato ideato un altro metodo per valutare l'efficacia dell'immunoterapia ovvero i criteri irRC (68); questi sono stati elaborati a partire da uno studio in cui si andava a valutare l'efficacia dell'ipilimumab. Questi nuovi criteri danno una maggior importanza al carico totale di malattia (Total tumor burden) e minore importanza alle lesioni target e indicano che qualsiasi risposta ottenuta, che sia diversa dalla stabilità di malattia, va rivalutata a distanza di 4 settimane con un'altra TC. Anche in questo caso abbiamo 4 scenari possibili:

- **Risposta completa (irCR):** si ha la scomparsa totale di tutte le lesioni sia target che non target
- **Risposta parziale (irPR):** si ha una riduzione maggiore del 50% del tumor burden iniziale
- **Progressione di malattia (irPD):** si ha un aumento maggiore del 25% del tumor burden iniziale

- **Stabilità di malattia (irSD):** se la malattia mostra un aumento inferiore al 25% rispetto il più piccolo tumor burden registrato al o una diminuzione inferiore al 50% rispetto ai valori di riferimento.

Uno dei limiti dei criteri RECIST immunorelati è la scarsa importanza che viene data alle lesioni linfonodali, di cui non viene specificato come misurare i diametri. Successivamente si è tentato di adattare i criteri irRC ai criteri RECIST 1.1 sono dunque nati i criteri irRECIST; Questi sono stati sviluppati basandosi solo su dati provenienti da pazienti trattati ipilimumab e anti PD1 e identificano 5 stadi di malattia:

- Risposta completa (CR): scomparsa di tutte le lesioni, confermata dopo 4 settimane
- Stabilità di malattia (iSD): né PR o PD in assenza di progressione di nuove lesioni o di lesioni non target
- Malattia in progressione non confermata (iUPD): aumento del 20% del carico tumorale dal nadir progressione delle lesioni non target o comparsa di nuove lesioni. La progressione viene confermata in caso se la valutazione effettuata dopo 4/8 settimane attesta l'aumento della somma delle lesioni target di almeno 5 mm
- Malattia in progressione confermata (iCPD) (vedi sopra) (68)

	RECIST	irRECIST	irRC
Valutazione della lesione	Unidimensionale	Unidimensionale	Bidimensionale
Parametro misurato	>10 mm	>10 mm	>5x5 mm
Valutazione della risposta	Risposta completa: scomparsa delle lesioni Risposta parziale: riduzione > 30% del carico tumorale iniziale Progressione di malattia: aumento > 20% del carico tumorale iniziale	Risposta completa: scomparsa delle lesioni Risposta parziale: riduzione > 30% del carico tumorale iniziale Progressione di malattia: aumento > 20% del carico tumorale iniziale (minimo 5mm)	Risposta completa: scomparsa delle lesioni Risposta parziale: riduzione > 50% del carico tumorale iniziale Progressione di malattia: aumento > 25% del carico tumorale iniziale
Conferma	4 settimane dopo il primo	4 settimane dopo il	4 settimane dopo il

del risultato	controllo	primo controllo (fino a 12 se serve a confermare PD)	primo controllo
----------------------	-----------	--	-----------------

Follow-up:

Per follow-up si intende un controllo periodico a cui vengono sottoposti i pazienti che sono stati sottoposti a trattamento per neoplasia. Comprende un insieme di esami clinici, biochimici e strumentali che vanno ripetuti periodicamente (l'arco temporale dipende dal tumore e dallo stadio). Il principale obiettivo del follow-up è intercettare precocemente una ripresa di malattia (che sia essa una recidiva o la comparsa di metastasi) con il fine ultimo di ottenere un miglioramento della sopravvivenza, ma anche valutare gli eventuali effetti avversi di determinate terapie, la comparsa di un secondo tumore che nulla ha a che fare con quello precedentemente individuato. Obiettivo del follow-up è anche continuare ad educare il paziente su determinati stili di vita da mantenere e metterlo in guardia dai fattori di rischio che potrebbero concorrere ad una nuova ripresa di malattia. Nel caso del melanoma la durata del follow-up ottimale non è ancora chiara in quanto la ripresa di malattia si ha solitamente entro i primi 5 anni (di solito nei primi 3 anni) ma anche recidive tardive non possono essere escluse, anche oltre i 10 anni. Solitamente dopo i 5 anni si esegue come follow-up una semplice visita dermatologica che si associa o meno a esami strumentali solo in caso ci siano particolari indicazioni cliniche. Il paziente con diagnosi di melanoma dovrebbe comunque sottoporsi annualmente vita natural durante a visita dermatologica in quanto il rischio di andare incontro a un secondo melanoma è del 4-8%. Particolare attenzione meritano i pazienti affetti da patologie sindromiche come la FAMM o NF1 ai quali andrebbe anche consigliata una valutazione oculistica periodica assieme al controllo dei nevi (69). Secondo le linee guida AIOM 2019 i follow-up meritano una distinzione in base allo stadio di malattia a cui i pazienti vengono intercettati.

- Melanoma in situ: viene consigliata la visita dermatologica annuale a meno che ci siano dei particolari nevi meritevoli di un'osservazione più frequente e quindi per questi si può consigliare una rivalutazione a 3/6 mesi (3).
- Melanoma in stadio IA: in questo caso il follow-up clinico si basa sulla visita semestrale/annuale (a discrezione del medico) dermatologica associata a valutazione linfonodale fino al 5° anno. Successivamente i controlli diventano annuali per altri 5 anni quindi il paziente viene sottoposto a controllo per 10 anni dalla diagnosi di

melanoma. il sottoporre il paziente ad esami strumentali non è raccomandato, solo in caso di sospetto su base clinico si può effettuare una ecografia linfonodale e dell'area pericicatrizziale (3).

- Melanoma in stadio IB-IIA: la visita va programmata ogni 6 mesi per i primi 5 anni, durante la quale visita è importante valutare attentamente i linfonodi distrettuali. Dopo i primi 5 anni la visita diventa annuale fino al 10° anno salvo la presenza di lesioni sospette o nevi atipici meritevoli di continuare ad essere studiati con una cadenza semestrale. Tra gli esami strumentali clinici all'ecografia linfonodale e dell'area pericicatrizziale semestrale si aggiunge un'ecografia addome annuale (3).
- Melanoma in stadio IIB: il follow-up clinico in questo caso prevede la visita dermatologica semestrale per i primi 5 anni con TC torace (annuale) e ecografia addome e linfonodale distrettuale e pericicatrizziale (semestrale). Dal 5° anno in poi si consiglia controllo annuale fino al 10° anno ad eccezione di nevi atipici o sospetti degni di rivalutazione semestrale (3).
- Melanoma in stadio IIC-III: il controllo clinico in questo caso si fa più frequente con visita ogni 3-4 mesi per i primi 24 mesi per poi diventare semestrale dal 3° al 5° anno. Dopo il 5° anno il controllo diventa annuale fino al 10° anno. A livello strumentale si consiglia l'ecografia linfonodale e dell'area pericicatrizziale ad ogni controllo clinico ed in più ogni 6/12 mesi si consiglia una TC o in caso non possa essere effettuata una PET/TC per i primi 3 anni. Fino al 5° anno poi si consiglia di continuare a eseguire la TC o PET/TC con cadenza annuale (3).
- Melanoma in stadio III non resecabile o IV: il controllo clinico va programmato ogni 3 mesi per i primi 24 mesi, dal 3° al 5° anno va effettuato ogni 6 mesi e dal 5° al 10° anno annualmente sempre associata a visita della cute annuale. Ogni 3-6 mesi è anche consigliato sottoporre il paziente a una TAC total body o PET/TC (in caso la scelta debba ricadere sulla PET a questa si deve associare una RMN encefalo) alla ricerca di possibili localizzazioni secondarie. Tale programma viene svolto solo in caso il paziente non venga più sottoposto a terapia medica attiva(3).

PARTE II

LE SEMAFORINE:

Le semaforine costituiscono una famiglia di proteine importanti dal punto di vista biologico in quanto ricoprono un ruolo essenziale in determinati processi fisiologici. Sono state individuate e caratterizzate per la prima volta all'inizio degli anni '90 a causa della loro tendenza ad influenzare la crescita assonale; Inizialmente la prima semaforina scoperta, che è quella che ad oggi viene identificata come SEMA1A, era stata denominata "Fasciclina IV" e fu individuata nella fase di sviluppo assonale embrionale della cavalletta. Quasi contemporaneamente un altro membro della famiglia delle semaforine, SEMA3A, venne scoperta nel cervello embrionale del pollo e nominata "Collapsina" in quanto determinava il collasso dei coni di crescita neuronale (70). Ad oggi questa famiglia di proteine viene considerata una delle 4 classi di molecole che conducono lo sviluppo neuronale assieme alle netrine, alle proteine slit e alle efrine. Da allora la famiglia delle semaforine si è andata ad accrescere sempre di più arrivando ad includere 30 proteine le quali sono divise in 8 classi in base alle caratteristiche strutturali e alla distribuzione nelle diverse specie (70). Le classi 1 e 2 infatti comprendono semaforine che sono state rinvenute solo negli invertebrati mentre le classi che vanno dalla 3 alla 7 comprendono le semaforine individuate nei vertebrati. La caratteristica distintiva delle semaforine è rappresentato dal "SEMA domain" un dominio composto da circa 500 aminoacidi localizzato a livello del dominio N-terminale la quale presenza è fondamentale per il signaling. Grazie alla notevole diversità e alla loro attitudine a interagire con diversi recettori le semaforine sono implicate in una lunghissima lista di processi fisiologici che va di giorno in giorno aumentando. Come abbiamo inizialmente indicato concorrono allo sviluppo del sistema nervoso, ma si è visto che intervengono anche in altri processi del sistema cardiocircolatorio e del sistema immunitario. Inoltre recenti studi hanno individuato un possibile coinvolgimento di queste proteine nella progressione tumorale (71). Nel sistema circolatorio il signaling SEMA-mediato è coinvolto principalmente nella vasculogenesi, nell'angiogenesi e nello sviluppo del sistema linfatico. Nel sistema vascolare dell'adulto invece le semaforine vanno ad influenzare la permeabilità vascolare e la risposta alle lesioni vascolari. Entrambi questi aspetti sono correlati alla creazione e al mantenimento delle giunzioni cellulari mentre per quanto riguarda la riparazione delle lesioni vascolari sembra che le semaforine in genere ma in modo particolare SEMA4D svolga un ruolo importante nel determinare la formazione del legame tra le piastrine che porta alla formazione del trombo emostatico (70). Inoltre si è visto che le semaforine vanno ad antagonizzare gli effetti dei fattori endoteliali di crescita vascolare (VEGFs), mentre questo influenza il pattern

d'espressione delle plexine ovvero uno dei recettori ai quali le semaforine si legano per trasdurre il segnale. C'è quindi una notevole interazione tra VEGF e le semaforine e ciò spiega il loro ruolo nel sistema cardiovascolare (70). Un altro ambito in cui si è notata l'importanza dell'espressione delle semaforine è nell'ambito tumorale. Vari studi infatti hanno riportato che l'espressione delle semaforine risulta alterata nelle cellule tumorali e nelle cellule del microambiente tumorale. SEMA3A ad esempio inibisce la motilità delle cellule tumorali della prostata e della mammella e allo stesso modo altri membri della famiglia intervengono in altre tipologie di cancro come ad esempio SEMA3B e 3F che inibiscono la crescita e lo sviluppo delle cellule tumorali polmonari (70). Nonostante sembri che il ruolo delle semaforine sia solo prettamente antitumorale in realtà alcuni membri della famiglia risultano iperespressi a livello tumorale in quanto promuovono l'angiogenesi neoplastica come SEMA4D, mentre altri che hanno una funzione anti-angiogenica, come ad esempio la classe 3, vengono down-regolati. Inoltre le semaforine regolano anche il comportamento di altre tipologie cellulari quali i fibroblasti e i macrofagi/monociti andando a stimolare la sintesi di molecole pro angiogeniche e pro infiammatorie. Quindi in sintesi il ruolo specifico delle semaforine nel contesto tumorale non è così certo, di regola si tratta di molecole che ricoprono un ruolo o di tipo antitumorale o pro-tumorale in base alla classe di cui fanno parte, ma la stessa semaforina in base al contesto tumorale in cui viene espressa può avere la duplice funzione. Questa dualità sembra essere dovuta in particolare alla presenza di molteplici recettori in modo particolare quelli tirosinchinasici con cui poi a livello cellulare va ad interagire e che trasducono il segnale in modo differente e che determinano in questo modo il carattere funzionale della semaforina (70).

Introduzione

Il melanoma maligno è diventata una delle neoplasie più frequenti nella popolazione di fototipo chiaro (72). Sebbene i melanomi cutanei diagnosticati allo stadio precoce siano solitamente aggredibili mediante resezione chirurgica, la rapida progressione verso l'invasività e la metastatizzazione della neoplasia è associata usualmente ad una scarsa sopravvivenza media (73). È ormai ben noto che prevedere il comportamento biologico dei melanomi cutanei facendo riferimento a criteri istologici risulti abbastanza complicato: infatti, i melanomi con spessore elevato possono rimanere localizzati senza metastatizzare per parecchi anni, mentre melanomi “sottili” possono evolvere rapidamente verso uno stato invasivo (74). Studi precedenti hanno identificato due parametri in particolare che influenzano sì la prognosi (75) ma che presentano un valore prognostico abbastanza limitato (76,77), trattasi della profondità di invasione della neoplasia espressa in millimetri (spessore di Breslow) e della profondità valutata secondo le strutture cutanee (livello di Clark). La ricerca di marcatori specifici per il melanoma è allo stato dell'arte un importante ambito di studio per tentare di individuare e comprendere maggiormente gli eventi molecolari che portano alla progressione del melanoma e in tal modo di poter identificare nuovi target molecolari fondamentali per impostare una terapia mirata ed efficace. L'angiogenesi tumorale è un processo/fenomeno essenziale per sviluppo, estensione e diffusione della neoplasia (78). Il mediatore principale dell'angiogenesi è VEGF-A (VEGF165) (79): infatti, è stato dimostrato che la sua espressione è assente nei melanociti non tumorali mentre vi è una up-regolazione di questo gene nei melanociti neoplastici (80). Diversi studi hanno segnalato che l'espressione di VEGF-A potrebbe essere un promettente fattore prognostico nel melanoma cutaneo (81) anche se rimane ancora completamente da chiarire il ruolo che tale fattore angiogenico ricopre nel follow-up clinico e nella determinazione della prognosi, tra cui anche della sopravvivenza generale (82). Le terapie anti-angiogeniche attualmente approvate per il trattamento di molteplici neoplasie solide inibiscono VEGF-A e bloccano l'attivazione del suo recettore. Tuttavia nella maggior parte degli ambienti clinici, come anche nel melanoma, è stata osservata da parte delle cellule neoplastiche una particolare resistenza alla terapia con il solo anti-VEGF probabilmente dovuta o all'attivazione di pathways angiogenetici alternativi o ad ulteriori vari fattori molecolari che determinano la vascolarizzazione tumorale (83). Nell'ambito di tali fattori il nostro gruppo di ricerca ha individuato le semaforine: in particolare alcuni specifici membri della famiglia delle semaforine-3 (SEMA3) sono coinvolti nella soppressione dell'angiogenesi tumorale attraverso l'inibizione dell'effetto angiogenetico del VEGF165 grazie alla competizione per il legame con la neuropilina1 (84). È stato

dimostrato che le semaforine-3 siano coinvolte in diversi processi fisiologici quali la migrazione cellulare e la regolazione della risposta immunitaria (85); in particolare è stato osservato che SEMA3A si configura come un potente soppressore tumorale nel modello murino di melanoma (86). Fino ad oggi però non era disponibile nessuna informazione sul pattern di espressione di SEMA3A nel melanoma cutaneo umano. Per chiarire il coinvolgimento di VEGF e SEMA3A in tale contesto e la loro attendibilità come marker prognostici, abbiamo esaminato i valori di espressione di questi due marker mediante l'immunoistochimica e il livello di espressione dell'mRNA di entrambi i fattori in 60 melanomi maligni cutanei sottili, 60 a spessore intermedio e 50 a spessore elevato. Abbiamo inoltre confrontato la loro espressione in base ai parametri clinici e patologici quali lo spessore di Breslow, il livello di Clark, l'infiltrazione del tumore da parte delle cellule immunitarie, lo stato metastatico e la sopravvivenza malattia correlata.

Materiali e metodi

Raccolta dei campioni:

Sono stati raccolti 170 casi di lesioni cutanee maligne dagli archivi dell'istituto di Anatomia Patologica dell'Università Politecnica delle Marche. Le diagnosi erano state fatte mediante sezioni ottenute con la colorazione ematossilina-eosina (87) basandosi sui soliti criteri diagnostici (88). Sono state valutate le caratteristiche cliniche dei pazienti quali sesso, età, localizzazione, dimensione tumorale e esito della malattia. Lo spessore tumorale è stato misurato da due dei nostri ricercatori (87). I casi con spessore di Breslow inferiore ad 1 mm sono stati riuniti nel gruppo dei melanomi sottili, i casi con uno spessore tra 1.1 e 4 mm sono stati considerati melanomi a spessore intermedio mentre quelli con spessore maggiore di 4 mm sono stati raccolti nel gruppo dei melanomi ad elevato spessore. Nessuno dei pazienti era stato sottoposto a trattamento con terapia adiuvante, immunoterapia o target therapy. Nel valutare la presenza o meno di metastasi nel linfonodo sentinella si è fatto riferimento al protocollo standard istituzionale che richiede l'asportazione del linfonodo sentinella nei melanomi con spessore entro i 2 mm e lo studio del linfonodo eseguito con la colorazione ematossilina-eosina. I linfonodi negativi macroscopicamente sono stati sottoposti ad ulteriore indagine con l'intento di trovare micrometastasi tramite immunoistochimica utilizzando gli anticorpi antiMelanA (EP1422Y; abcam Cambridge, Massachusetts) e l'anti melanosoma umano (clone HMB45; Agilent Dako Products, Santa Clara California). Per lo scopo dello studio sono stati arruolati solo pazienti senza coinvolgimento linfonodale né presenza di metastasi a distanza al momento della diagnosi. Tutti i pazienti sono stati seguiti per almeno 5

anni in seguito all'asportazione chirurgica e sono stati registrati sia la comparsa di metastasi linfonodali che a distanza sia l'eventuale decesso del paziente. La comparsa di metastasi linfonodali e solide è stata indicata come M1 e la loro assenza come M0. La sopravvivenza globale (OS) che è stata definita come il periodo di tempo che va dalla data dell'operazione fino alla morte a causa del melanoma o all'ultimo follow-up è stata utilizzata come parametro per la / una valutazione della prognosi. Il follow-up medio dei pazienti è stato di 134 mesi (con un range che va dai 48 ai 168 mesi). Queste informazioni sono state scritte con il consenso di tutti i pazienti in accordo alla dichiarazione di Helsinki. Il nostro comitato etico ha approvato il disegno dello studio.

Immunoistochimica e valutazione dell'espressione dei marker:

La colorazione immunoistochimica è stata eseguita su sezioni seriali di spessore di 5 µm incluse in paraffina secondo le indicazioni dello studio eseguito da Simonetti et al (87). Le sezioni sono state incubate a 4°C per tutta la notte con i seguenti anticorpi primari: anti semaforina 3A(SEMA3A; sc-10720, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), anti-VEGF165 (sc-7269, Santa Cruz Biotechnology), e l'anticorpo anti CD34 (clone HPCA1, Beckton Dickinson, Erembodegem, Belgium) per l'analisi della densità dei capillari. Come controlli positivi abbiamo utilizzato campioni di cellule derivanti da neoplasia polmonare non a piccole cellule per il VEGF e CD34 e campioni di tessuto di mucosa gastrica sana per SEMA3A; nei controlli negativi invece gli anticorpi primari sono stati sostituiti con il siero non immune. La valutazione immunoistochimica è stata eseguita al microscopio ottico e in maniera indipendente da parte di due osservatori (G.G e G.L) in cieco in riferimento al gruppo di appartenenza dei pazienti. Le cellule positive per SEMA3A, VEGF e CD34 sono state valutate in almeno 10 campi/campione (area di ogni campo 0.07mm²; il software di imaging utilizzato è NIS Elements BR 3.22; Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Olanda) ad un ingrandimento di 400x e quantificato come percentuale del totale di cellule o vasi contati. I campi sono stati selezionati in modo casuale valutando le aree maggiormente positive, quelle moderatamente positive e quelle meno positive.

Isolamento dell'RNA e real time PCR quantitativa:

L'RNA totale è stato isolato dai campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) usando il kit di purificazione FFPE-RNA (NORGEN Biotek, Thorold, Ontario Canada) seguendo le istruzioni dei produttori. L'RNA è stato studiato per determinare il rapporto delle assorbanze a 260/280 nm (<1.9) usando uno spettrofotometro (Nanodrop; Euroclone, Milano

Italia) e trattato con una DNasi Rnasi-free prima di essere sottoposta a trascrizione inversa in cDNA. L'RNA è stato conservato a -80°C fino al suo utilizzo. Un microgrammo dell'RNA totale è stato sottoposto a trascrizione inversa con il kit iScript Selecte cDNA Synthesis (Biorad, Milano, Italia), usando i primer progettati geni-specifici, seguendo le istruzioni dei progettatori. L'analisi della Real Time PCR è stata eseguita utilizzando EVA Green PCR master Mix (Biorad) e il macchinario Master Cycle (Eppendorf, Milano, Italia). Tutti i campioni sono stati testati in triplice copia con il gene di riferimento gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) per la normalizzazione dei dati. Dopo l'amplificazione sono state acquisite le curve di fusione. Tutti i primer sono stati prodotti dalla Sigma Genosis (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Le sequenze dei primer dei geni erano: per SEMA3A in parallelo TGGACATCATCCTGAGGACA e in antiparallelo CTCGTCCTGATTGGGTGGT, per VEGF in parallelo CCTCCGAAACCATAAC e in antiparallelo ATGATTCTGCCCTCCTCCTTCT, per il GAPDH in parallelo TCTCCATGGTGGTGAAGAC e in antiparallelo GATTCCACCCATGGCAAAT. La quota dell'espressione del mRNA è stata calcolata seguendo il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dove $\Delta Ct = Ct$ del gene interessato - Ct del gene di controllo. I valori della relativa espressione dei geni di interesse sono stati riportati come media $\pm$ SD sui tre esperimenti indipendenti.

Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state svolte utilizzando il pacchetto SPSS 16 (SPSS Inc., Chicago, Illinois); le differenze riscontrate tra i valori medi nelle differenti categorie sono state analizzate secondo il t-test di Student indipendente per l'analisi del test di varianza e la correzione di Bonferroni. La correlazione di Pearson è stata utilizzata per studiare la relazione tra l'espressione dei marker e le caratteristiche fisiopatologiche. Le curve di sopravvivenza globale sono state calcolate con il metodo di Kaplan-Meier e sono state analizzate con il log-rank test. La $P < 0.05$ è stata definita per indicare le differenze statisticamente significative.

Risultati:

Caratteristiche cliniche e istopatologiche:

Tabella 1. Caratteristiche cliniche dei pazienti

Caratteristiche	Numero di pazienti	Correlazione di Pearson
Maschio	83 (49%)	
Femmina	87(51%)	
Testa e collo	34 (20%)	
Tronco	59(35%)	
Arti superiori	17(10%)	
Arti inferiori	59(30%)	
Spessore di Breslow		
≤1.0mm	60 (35%)	
1.1mm-4.0mm	60(35%)	
>4mm	50 (30%)	
Livello di Clark (numero di pazienti appartenenti a tale livello)		P < 0.001
II (48)	48 sottili	
III (35)	12 sottili-23 intermedi	
IV (60)	25 intermedi-35 spessi	
V (27)	12 intermedi-15 spessi	
Presenza di infiltrato immunocellulare		P = 0.174
Assente/raro	51 sottili-50 a spessore intermedio-50 a spessore elevato	
Medio/molto presente	9 sottili-10 a spessore intermedio	
Metastasi		
M0 (110)	60 sottili- 30 a spessore intermedio- 23 a spessore elevato	P = 0.62
M1 (57)	30 intermedi - 27 ad elevato spessore	
M0 (110)	48 II-35 III-25 IV-5V	P = 0.071

M1(57)	35 IV – 22 V	
--------	--------------	--

Lo spessore di Breslow solitamente va da 0.3 mm a 8 mm. Quarantotto tra i melanomi sottili (80%) avevano un secondo livello di Clark e 12 avevano un terzo livello di Clark (20%). 23 (39%) dei melanomi con spessore intermedio mostravano un livello terzo di Clark, 25 (41%) un quarto livello di Clark e 12 un quinto livello di Clark (20%); 35 (70%) dei melanomi ad elevato spessore avevano un quarto livello di Clark e i restanti un quinto livello di Clark (30%). Lo spessore di Breslow era positivamente correlato con il livello di Clark ($P < 0.001$; $r = 0.845$).

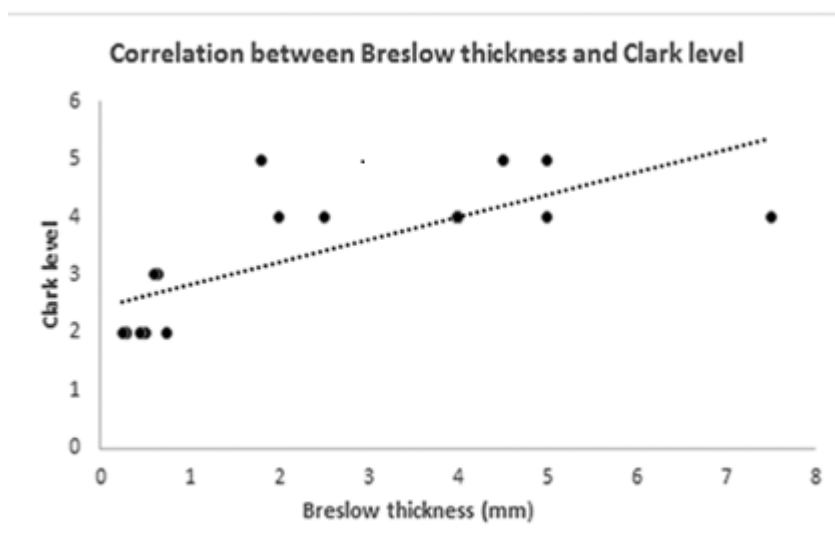


Fig. 1a Correlazione tra lo spessore di Breslow e il livello di Clark

L'infiltrato tumorale di cellule immunitarie era assente o poco presente in 51 dei melanomi sottili (87%), in 50 dei melanomi a spessore intermedio (83%) e in tutti i melanomi con elevato spessore. Un infiltrato tumorale di cellule immunitarie medio o particolarmente presente è stato riscontrato in 9 (12%) dei melanomi sottili e in 10 (17%) dei melanomi a spessore intermedio. Non è stata rilevata nessuna correlazione con lo spessore di Breslow ($P = 0.174$). Il 38% dei melanomi privi di infiltrato tumorale di cellule immunitarie hanno sviluppato metastasi e il 23.17% non sono sopravvissuti. Tutti i pazienti affetti da melanoma sottile non hanno mostrato nessuna evidenza di metastasi e nessuno è andato incontro a morte. 30 pazienti (50%) con melanoma a spessore intermedio hanno invece sviluppato metastasi e 18 ovvero il 30% sono deceduti a causa del melanoma. Tra i pazienti con melanoma ad elevato spessore 27 ovvero il 54% sono andati incontro a metastasi e 17 (36%) non sono

sopravvissuti. Non è stata rilevata nessuna differenza nella sopravvivenza globale e nell'insorgenza o meno di metastasi tra i pazienti con melanoma a spessore intermedio e pazienti con melanoma ad elevato spessore. La correlazione di Pearson non ha mostrato nessuna associazione significativa tra lo spessore di Breslow e lo stato metastatico ($P = 0.062$; $r = 0.571$) e tra lo spessore di Breslow e la sopravvivenza globale ($P = 0.066$; secondo l'analisi di Kaplan Meyer).

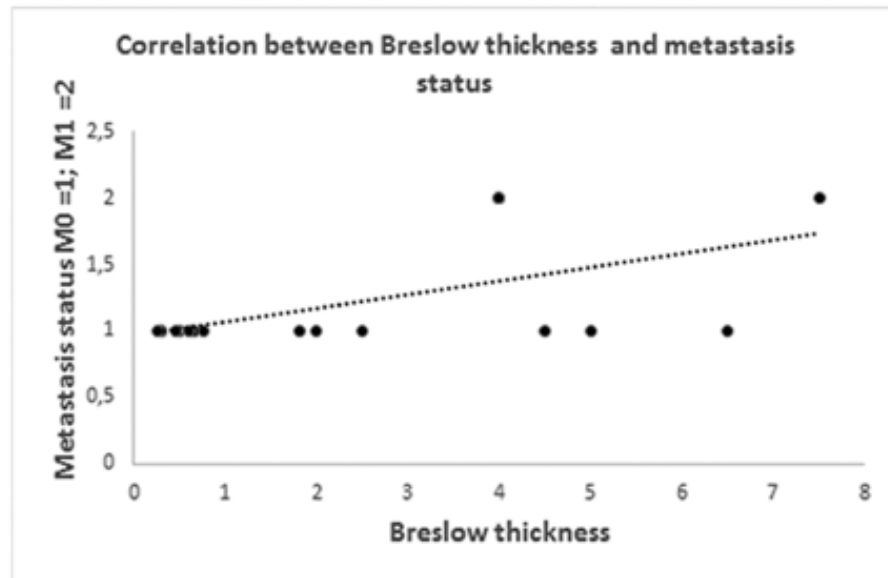


Fig. 1b Correlazione tra lo spessore di Breslow e la presenza (M1) o meno (M0) di metastasi

I pazienti con melanoma con livello di Clark II-III (110) non erano correlati a presenza di metastasi e erano vivi senza evidenza di malattia, mentre 57 casi ovvero il 66% dei pazienti il cui melanoma mostrava un livello di Clark IV-V presentava metastasi e 35 (40%) sono morti per la patologia. Il livello di Clark non è risultato correlato con la presenza di metastasi ($P = 0.071$; $r = 0.449$) ma si è dimostrato correlato ai limiti della significatività con la sopravvivenza globale: la mortalità è infatti aumentata nei pazienti con livello di Clark IV-V ($P = 0.048$).

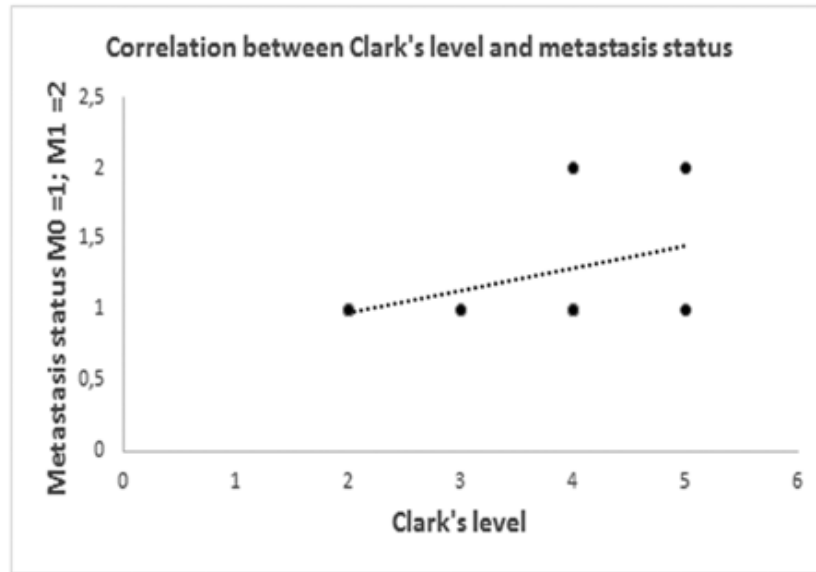


Fig1c: Correlazione tra il livello di Clark e la presenza o meno di metastasi

Espressione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF)

Il VEGF è stato rilevato nel citoplasma dei melanociti neoplastici e nelle cellule endoteliali dei vasi in tutti i melanomi. La sua espressione nei melanomi sottili è risultata significativamente bassa rapportata alla sua espressione negli altri gruppi, mentre i melanomi a spessore elevato mostravano un'espressione di VEGF maggiore rispetto agli altri. ($P < 0.05$ 2b). L'espressione di VEGF è risultata correlata positivamente con lo spessore di Breslow ($P < 0.001$; $r = 0.792$ Fig.2c) e i melanomi con livello di Clark IV- V hanno mostrato un'espressione significativamente più alta rispetto a quelli con livello di Clark II-III (Fig.2d); è stata quindi rilevata una associazione positiva tra l'espressione di VEGF e il livello di Clark ($P < 0.001$; $r = 0.90$ Fig.2c). L'espressione di VEGF non è risultata correlata alla presenza di infiltrato di cellule immunitarie ($P = 0.134$, $r = - 0.26$). Il valore medio di VEGF nei melanomi che hanno poi sviluppato metastasi era significativamente più alto rispetto ai melanomi non metastatici ($P < 0.001$ Fig.2e). Comunque, non è stata riscontrata alcuna correlazione con lo stato metastatico in base al test di Pearson ($P = 0.48$; $r = 0.356$); infatti, come mostrato dalla figura 2f, solo melanomi con spessore ridotto hanno mostrato bassi livelli di VEGF e assenza di metastasi; al contrario, nei melanomi a spessore intermedio e a spessore elevato con o senza presenza di metastasi sono stati rilevati valori di espressione di VEGF similmente elevati. L'espressione di VEGF non era un fattore predittivo di sviluppo metastatico per i melanomi con spessore di Breslow > 1 mm.

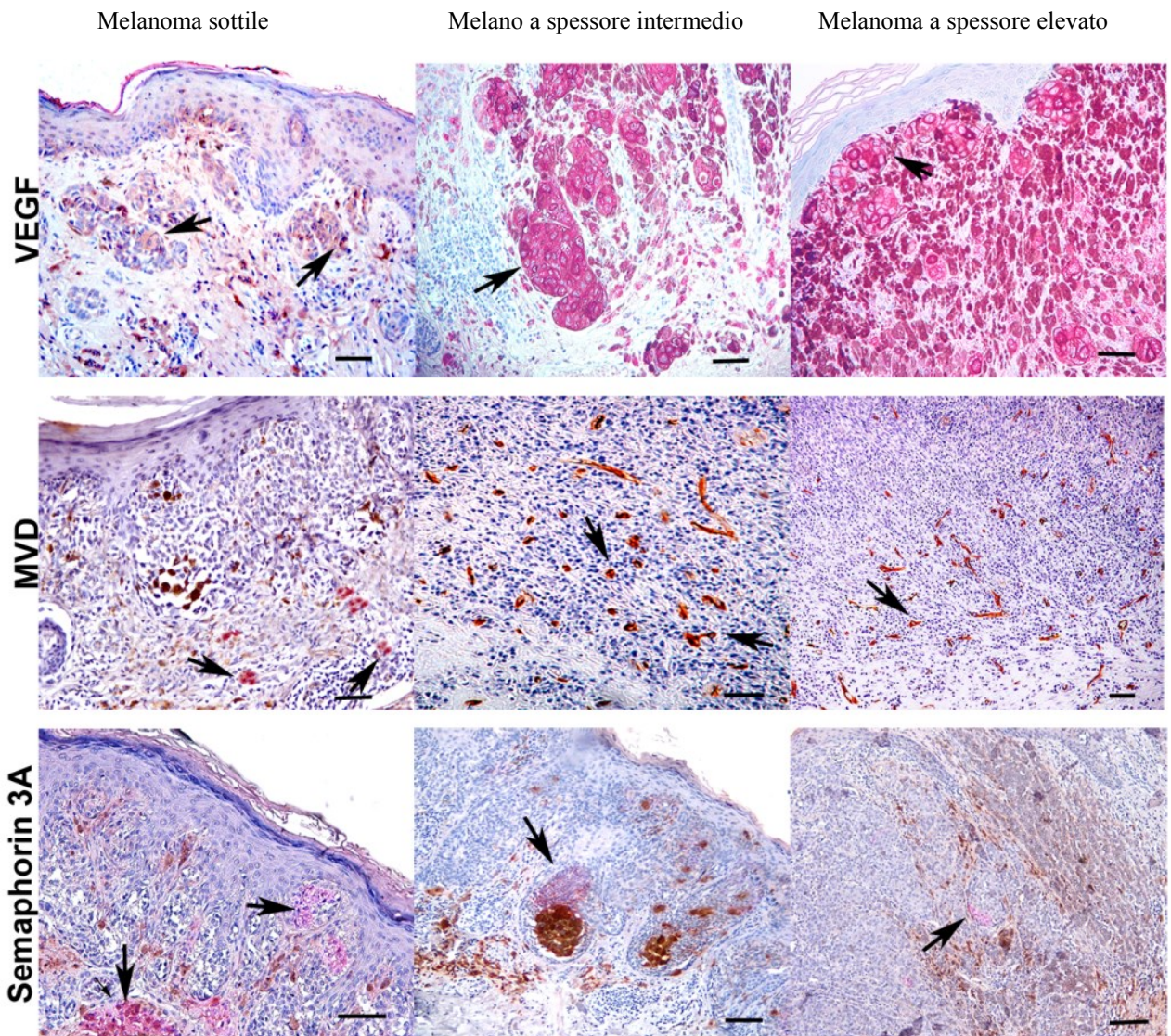


Fig 2a: Espressione immunoistochimica (↑) di VEGF, SEMA3A e densità microvascolare. Nei melanomi intermedi e a spessore elevato l'espressione di VEGF e la densità microvascolare erano più elevate, mentre l'espressione di SEMA3A era più bassa (a) (reazione della fosfatasi alcalina anti-fosfatasi alcalina, barra della scala: 100 μ m);

Densità microvascolare:

Quando abbiamo valutato la densità microvascolare, sono stati riscontrati risultati simili a quanto rilevato in merito all'espressione di VEGF: i valori più bassi sono stati riscontrati nei melanomi con spessore ridotto e i valori più importanti invece nei melanomi a spessore elevato ($P < 0.05$ Fig.2b). È stata riportata anche una correlazione positiva con lo spessore di Breslow ($P < 0.001$; $r = 0.927$, Fig.3b) e il livello di Clark ($P < 0.001$; $r = 0.887$) mentre non è stata trovata alcuna correlazione con la presenza di infiltrato tumorale di cellule immunitarie ($P = 0.354$; $r = -0.24$) e con la presenza o meno di metastasi ($P = 0.55$ $r = 0.37$ Fig 3c) ; infatti, un'elevata densità microvascolare è stata riscontrata nei melanomi a spessore

intermedio e ad elevato spessore e con un livello di Clark IV-V nonostante l'assenza di metastasi (Figure 2f e 3d, rispettivamente). La densità microvascolare non era quindi un fattore predittivo di metastasi per i melanomi con spessore di Breslow < 1 mm.

Semaforina 3A :

L'espressione di SEMA3A è stata rilevata nel citoplasma delle cellule tumorali (Fig.2a). Nei melanomi di spessore limitato la sua espressione è significativamente più alta rispetto agli altri due gruppi di neoplasie (Fig. 2b) ; quattro (33%) dei melanomi ad elevato spessore hanno invece mostrato la totale perdita di espressione della semaforina. Invece, non è stata riscontrata alcuna differenza in quanto all'espressione di tale marcatore tra il gruppo di melanoma a spessore intermedio e quello a spessore elevato. È stato notato che l'espressione di SEMA3A non è correlata con lo spessore di Breslow ($P = 0.09$; $r = -0.427$, Fig.3e) e, sebbene il livello di SEMA3A sia significativamente diminuito nei tumori con un livello di Clark di IV-V (Fig.2d), tale dato è correlato con il livello di Clark ai limiti della significatività, ($P = 0.048$; $r = -0.531$ Fig.3f). Non è stata rilevata alcuna correlazione tra la presenza di infiltrato immunocellulare e l'espressione della semaforina. ($P = 0.282$, $r = 0.277$). Curiosamente, i pazienti con una bassa espressione di SEMA3A (57 pazienti) (il range dell'espressione di SEMA3A va dallo 0 all'8%) hanno un'evidenza superiore di presenza di metastasi rispetto ai pazienti con un'alta espressione di SEMA3A (113 pazienti); (il range di espressione di SEMA3A va dal 15 al 33% con una $P < 0.001$; Fig.2e). Questi dati erano supportati dall'esistenza di una correlazione inversa significativa ($P = 0.02$; $r = -0.69$ Fig.3g). Le immagini 2f e 3h mostrano che tutti i pazienti privi di disseminazione metastatica hanno valori simili dell'espressione di SEMA3A così come quei pazienti che invece presentano metastasi. Quindi i valori di SEMA3A si sono dimostrati strettamente associati allo stato metastatico in tutti i melanomi studiati (figure 2f e 3h rispettivamente).

Rapporto tra il fattore di crescita endoteliale vascolare VEGF e la semaforina 3A

Il rapporto di espressione tra VEGF e SEMA3A è risultato significativamente più basso nei melanomi a ridotto spessore e nei melanomi con un livello di Clark di II-III rispetto agli altri due gruppi in studio (Fig. 2b e 2d) ma non si è notata alcuna correlazione con lo spessore di Breslow ($P = 0.055$; $r = 0.341$; Fig. 3i) , né con il livello di Clark ($P = 0.14$; $r = 0.375$; Fig 3l) né con la presenza di infiltrato tumorale immunocellulare ($P = 0.56$, $r = -0.149$). I pazienti che invece presentavano un alto rapporto VEGF/SEMA3A hanno mostrato una evidenza significativa di metastasi ($P < 0.001$; Figs 2e e 3n); tale associazione era coerente con il test

di correlazione di Pearson ($P = 0.01$; $r = 0.718$ Fig.3m). In sintesi, comparando il valore medio di VEGF, la densità capillare e l'espressione di SEMA3A, solamente l'espressione di SEMA3A e il rapporto tra VEGF/SEMA3A sono risultati fattori significativamente associati con l'evidenza di disseminazione metastatica. Infatti, i pazienti che presentavano melanomi con bassa espressione di SEMA3A e elevato rapporto VEGF / SEMA3A avevano maggiori probabilità di sviluppare metastasi.

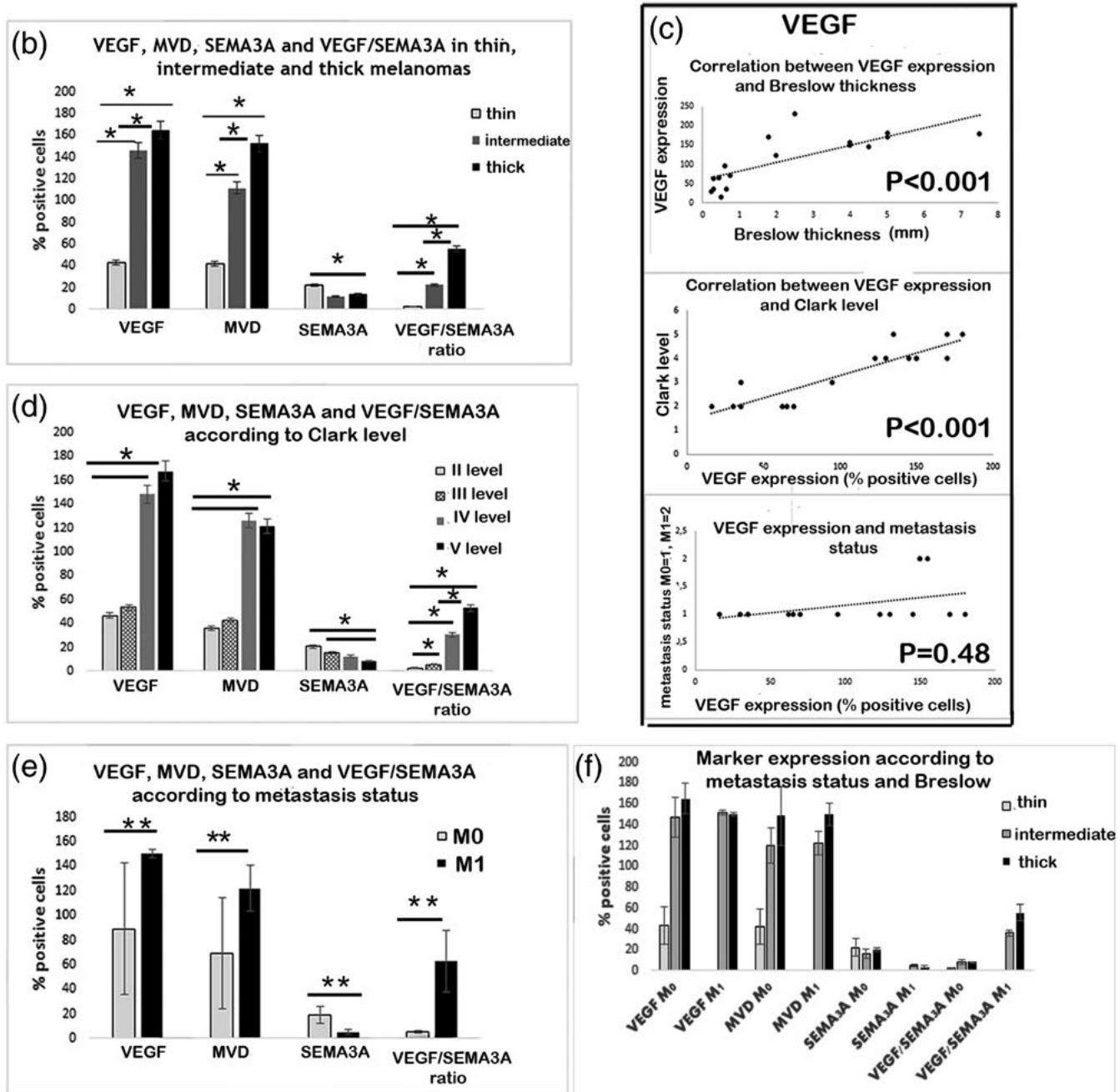


Fig2b, 2c, 2d, 2e, 2f: Rappresentazione statistica di VEGF, densità del microvaso, espressione di SEMA3A e rapporto VEGF / SEMA3A secondo lo spessore di Breslow (b), il livello di Clark (d), lo stato della metastasi (M0: assenza; M1: presenza; e – f); La correlazione di Pearson tra l'espressione di VEGF e lo spessore di Breslow, Livello di Clark e stato delle metastasi (c). * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$.

Correlazione tra i singoli marker immunoistochimici:

L'espressione di VEGF ha mostrato una significativa correlazione positiva con la densità capillare ($P < 0.001$; $r = 0.91$ Fig. 3o). Si è riscontrata una associazione negativa tra l'espressione di VEGF e quella di SEMA3A ($P = 0.040$; $r = -0.62$; Fig. 3p) e anche tra la densità capillare e SEMA3A ($P = 0.039$; $r = -0.585$; Fig. 3q). Inoltre, la densità capillare si è dimostrata positivamente correlata al rapporto tra VEGF e SEMA3A ($P = 0.038$; $r = 0.556$; Fig. 3r).

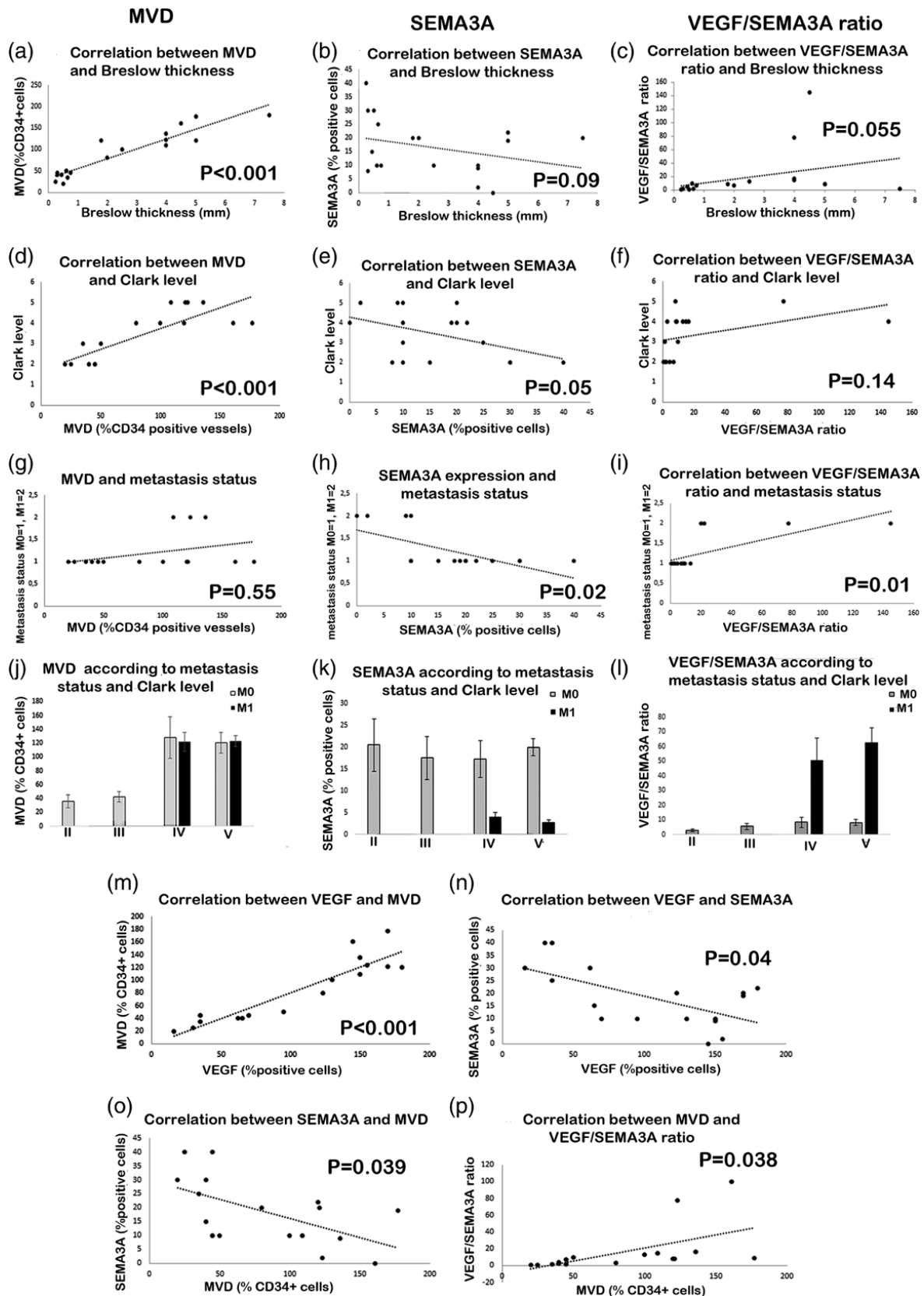


Fig. 3a-p Correlazione tra densità del microvaso (a – d), SEMA3A (e – h), rapporto VEGF / SEMA3A (i – n) e spessore di Breslow, livello di Clark e stato di metastasi (M0: assenza; M1: presenza); I rapporti SEMA3A e VEGF / SEMA3A erano significativamente associati alla presenza di metastasi.

Livelli di espressione dell'mRNA del fattore di crescita endoteliale vascolare e della semaforina 3A.

Dato che l'espressione immunoistochimica di SEMA3A e il rapporto tra VEGF/SEMA3A sono risultati essere i fattori più significativi associati alla presenza o meno di metastasi, abbiamo provveduto ad analizzare i livelli di espressione dell'mRNA di VEGF e SEMA3A.

La real time - PCR quantitativa (qRT-PCR) ha dimostrato che i livelli di mRNA di VEGF non erano associati significativamente con la presenza di metastasi ($P = 0.61$, $r = 0.12$; Fig 4a) a differenza dell'espressione dell'mRNA di SEMA3A ($P = 0.04$; $r = -0.50$; Fig 4b) e del rapporto VEGF/SEMA3A ($P = 0.01$; $r = 0.715$; 4c): i rapporti più alti sono stati trovati nei casi che hanno sviluppato metastasi ($P = 0.036$); Fig 4d).

Il test di correlazione di Pearson ha rilevato che i dati riguardanti i livelli di espressione dell'mRNA sono strettamente correlati con i dati di espressione immunoistochimica. ($P < 0.001$; $r = 0.923$; Fig 4e).

Analisi dell'espressione del fattore di crescita endoteliale vascolare, della densità capillare, dell'espressione della semaforina-3A e della sopravvivenza.

Per valutare se l'espressione dei marker e se i livelli di espressione sono correlati con la prognosi, le curve di sopravvivenza di Kaplan Meyer sono state prese in considerazione utilizzando la sopravvivenza a 5 anni complessiva o specifica per la malattia. L'analisi delle curve non ha mostrato alcuna relazione tra l'espressione di VEGF e la sopravvivenza globale ($P = 0.18$; Fig 5a); al contrario, un valore elevato di densità capillare era associato a una prognosi infausta, sebbene ai limiti della significatività statistica ($P = 0.048$; Fig. 5b). È interessante notare che livelli di espressione bassi di SEMA3A e, molto significativamente, un alto rapporto VEGF/SEMA3A sono risultati essere strettamente correlati ad una sopravvivenza più scarsa ($P = 0.017$ e $P < 0.001$, Fig 5c,d, rispettivamente). I risultati ottenuti dall'analisi della Real Time PCR quantitativa ha dimostrato dati simili. (Fig. 5e-g)

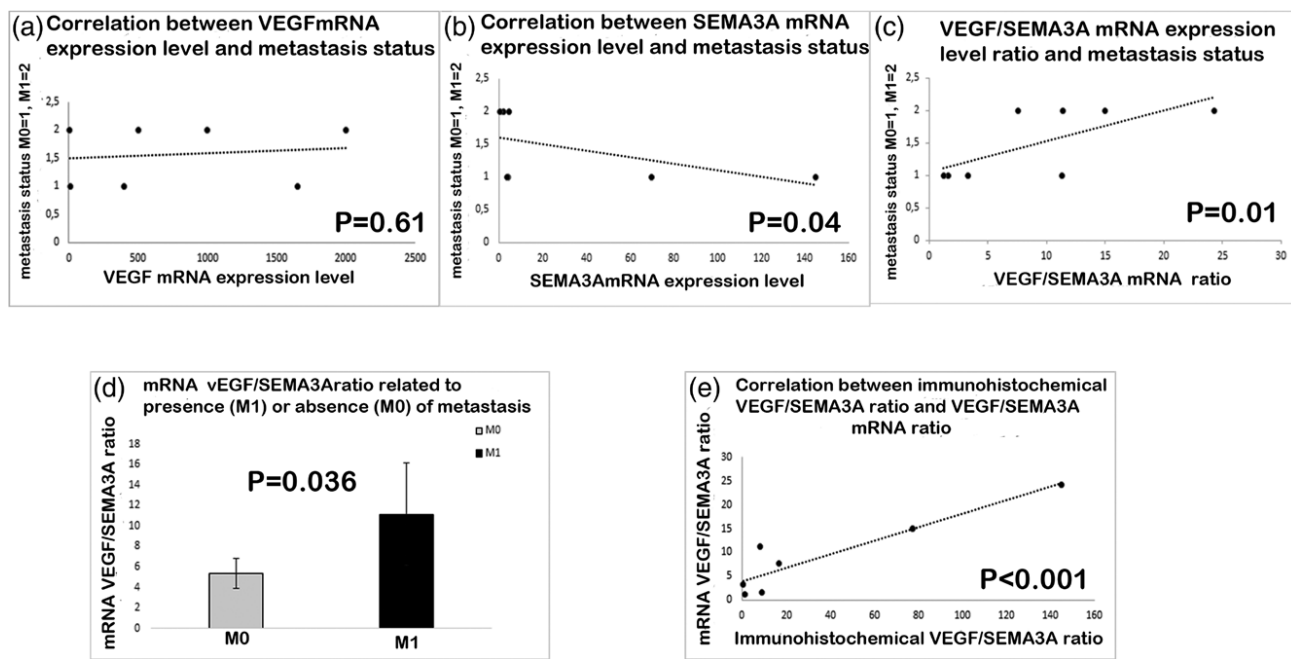


Fig4a-e: Correlazione tra VEGF, livello di espressione di mRNA di SEMA3A, rapporto VEGF / SEMA3A e stato di metastasi (M: assenza; M2: presenza; a – d); Il test di correlazione di Pearson ha attestato che i dati sul livello di espressione dell'mRNA erano fortemente correlati con i dati di espressione immunoistochimica (e)

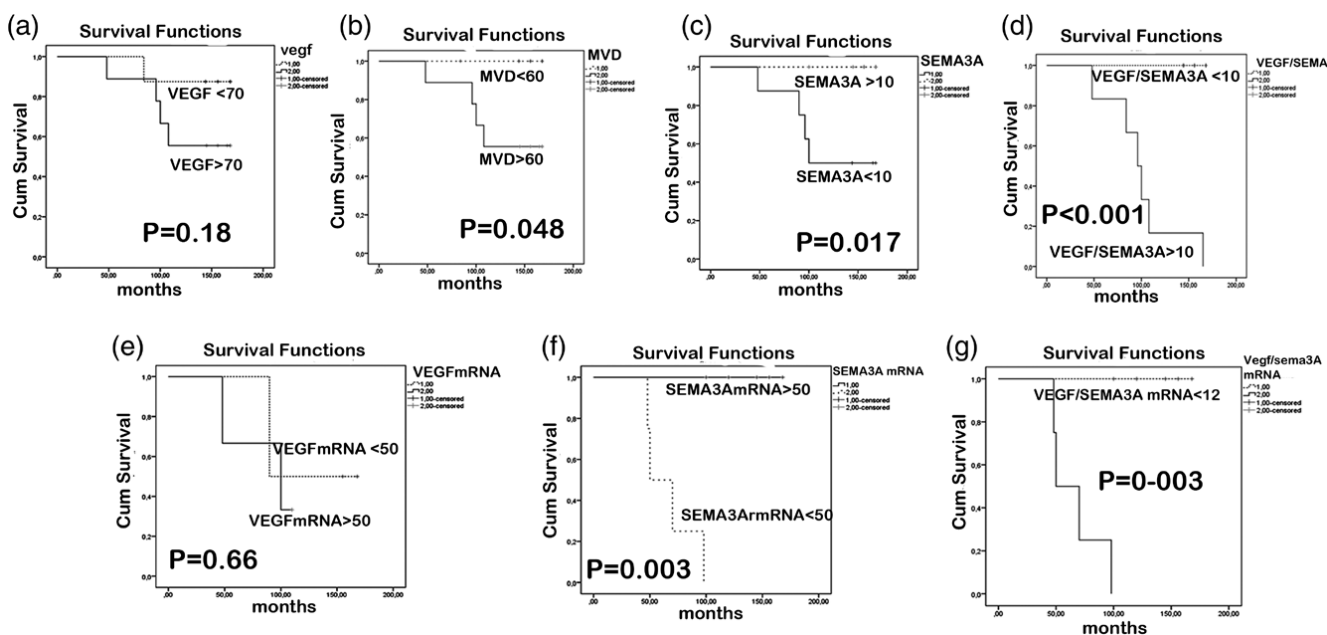


Fig 5 a-g: Le curve di Kaplan-Meier per la sopravvivenza libera da malattia in relazione al livello di espressione immunoistochimica e di mRNA di VEGF, alla densità microvascolare, al rapporto SEMA3A e VEGF / SEMA3A. L'espressione di SEMA3A (c, f) e il rapporto VEGF / SEMA3A (d, g) sono risultati fattori strettamente correlati con la sopravvivenza.

Discussione:

Più del 90% della mortalità per malattia neoplastica è attribuibile alle metastasi, ma non ai tumori primari. Studi hanno indicato che le metastasi nascono dall'evoluzione somatica di una popolazione di cellule tumorali diversificate geneticamente (89). È quindi importante avere una conoscenza dettagliata della fisiopatologia del melanoma maligno, al fine di sviluppare nuovi fattori prognostici e strategie terapeutiche. Risulta molto difficile prevedere il comportamento clinico del melanoma cutaneo utilizzando i parametri clinici e istologici tradizionali. I criteri istopatologici per le lesioni melanocitarie sono i fattori prognostici fondamentali per il melanoma; tuttavia ci sono determinati casi in cui tali parametri non riescono a predire l'espansione del melanoma. Lo spessore di Breslow del tumore è ancora oggi un importante fattore prognostico per valutare l'intervallo libero da malattia e la sopravvivenza globale. Mano a mano che aumenta lo spessore del tumore primario, c'è una significativa diminuzione della sopravvivenza; I pazienti con melanoma a ridotto spessore possono essere rassicurati sul fatto che il loro rischio di una prognosi infausta sia estremamente basso (90). Tuttavia tale aspettativa non è sempre vera: una porzione importante di pazienti con melanoma a spessore intermedio ed elevato presenta una sopravvivenza a lungo termine notevole (il 45% anche più di 10 anni) e non sviluppa metastasi regionali o a distanza (91). I nostri risultati confermano tali dati: il 50% dei pazienti con melanoma a spessore intermedio ed elevato non vanno incontro a malattia metastatica con un 70% di sopravvivenza a 10 anni. Nessuna significativa differenza è stata riscontrata per quanto riguarda la presenza di metastasi e la sopravvivenza globale tra questi pazienti. Si è rilevato che lo spessore di Breslow non è un valido fattore prognostico e si è mostrato che anche il livello di Clark non è correlato con la presenza di malattia metastatica mentre presenta una correlazione con la sopravvivenza globale. Il livello di Clark ha storicamente avuto un significato prognostico, in quanto un livello di Clark crescente era associato ad una prognosi infausta, sebbene il suo significato prognostico era forse più evidente nelle lesioni a ridotto spessore, e come tale è stato incluso nelle precedenti edizioni del sistema di stadiazione (92). Tuttavia studi recenti hanno suggerito la mancanza di un valore prognostico indipendente significativo (77). Questo mostra chiaramente che è necessario lavorare sulla ricerca di nuovi fattori prognostici che consentirebbero una previsione più precisa del decorso di malattia rispetto ai parametri istologici e clinici tradizionali. Inoltre la definizione di sottogruppi molecolari può identificare pazienti che potrebbero beneficiare di terapie mirate e trattamenti personalizzati. Numerosi autori hanno riportato che l'espressione del VEGF-A potrebbe essere un fattore prognostico ottimale nei melanomi cutanei poiché una sua elevata

espressione è associata allo sviluppo di metastasi e ad una prognosi infausta(81). Al contrario alcuni studi hanno segnalato che un'espressione elevata di VEGF è di frequente riscontro nei melanomi cutanei maligni ma che non era correlato all'aggressività del tumore e alla prognosi (93,94). Sebbene sia stato riscontrato un aumento dell'espressione di VEGF e della densità capillare nei melanomi con spessore più elevato rispetto a quelli sottili (94,95), il loro valore prognostico nei melanomi cutanei umani è ancora da chiarire (96). I nostri risultati confermano che l'espressione del VEGF e la densità capillare sono significativamente maggiori nei melanomi con spessore intermedio ed elevato ed anche nelle lesioni che posseggono un livello di Clark IV-V, ma non è stata dimostrata nessuna correlazione con la sopravvivenza globale e con la presenza o meno di metastasi a distanza. Come spiegazione a ciò, si potrebbe annotare che solo i melanomi sottili hanno mostrato bassi livelli di VEGF, una bassa densità capillare e l'assenza di metastasi; al contrario i melanomi a spessore elevato ed intermedio hanno palesato simili elevati valori di questi marcatori a dispetto dello stato metastatico e della sopravvivenza. Tali risultati suggeriscono che l'espressione di VEGF e la densità capillare non possono essere considerati biomarcatori prognostici validi nel melanoma cutaneo, in particolare nel melanoma con uno spessore > 1mm. I membri della famiglia degli anti-VEGF, in particolare quelli che hanno come bersaglio tutte le isoforme VEGF-A, sono utilizzati come agenti antiangiogenetici nella terapia tumorale ed anche nel trattamento del melanoma (82). Tuttavia, essi non sono riusciti a fornire un'attività antitumorale coerente nel contesto clinico e, inoltre, il trattamento era associato a effetti collaterali inaspettati e all'acquisizione di resistenza da parte della neoplasia (97). Potenziali colpevoli del fatto che questi agenti antiangiogenetici abbiano una moderata efficienza sono la natura multifattoriale della neovascolarizzazione, le numerose alternative vie di trasduzione del segnale e i regolatori di VEGF coinvolti nella angiogenesi tumorale. Le terapie antiangiogenetiche modificate mirano a superare questo problema in futuro (98,99). L'angiogenesi è un processo altamente regolato controllato da numerose molecole tra le quali abbiamo le neuropiline e le semaforine (100). La neuropilina 1 e la neuropilina 2 sono dei recettori transmembranari di VEGF che sono stati identificati anche come recettori per le semaforine di classe 3 (101). Il ruolo delle semaforine in diversi processi fisiologici e fisiopatologici quali la migrazione cellulare, la regolazione della risposta immunitaria, l'angiogenesi e lo sviluppo di neoplasia è stato ben studiato (85). Tra le varie semaforine, membri selezionati della famiglia delle SEMA3 sono coinvolti nell'angiogenesi tumorale e nella soppressione tumorale (102); in particolare SEMA3A inibisce la migrazione e l'adesione delle cellule endoteliali, promuove l'apoptosi e inibisce la crescita e l'invasione tumorale (103). Diversi studi hanno dimostrato

che l'espressione di SEMA3A è spesso persa nei tumori in stadio avanzato e ciò è significativamente correlato con una prognosi infausta, mentre una sua overespressione inibisce significativamente la crescita tumorale (104-107). Un possibile meccanismo attraverso il quale SEMA3A potrebbe regolare l'angiogenesi è interferendo con il signalling VEGF-mediato attraverso la competizione per il legame con la neuropilina 1 (108,109). La neuropilina 1 è una molecola chiave per l'angiogenesi e la progressione tumorale (110); la sua azione sembra principalmente essere regolata da una interazione tra SEMA3A e VEGF (108). Nel nostro studio sono stati valutati per la prima volta i livelli immunoistochimici di espressione di SEMA3A e del suo RNA messaggero e il suo ruolo prognostico nel melanoma maligno cutaneo. Per quello che ci risulta, SEMA3A era stata analizzata precedentemente solo in modelli murini di melanoma, nei quali sembrava agire come un potente soppressore tumorale (86,110). In questo studio abbiamo rilevato che l'espressione di SEMA3A era significativamente ridotta nel melanoma a spessore intermedio e a spessore elevato così come nei melanomi con un livello di Clark più elevato. Tuttavia la nostra più importante scoperta è che l'espressione di SEMA3A è risultata essere un importante fattore prognostico nel melanoma cutaneo: la sua perdita di espressione è strettamente correlata con la presenza di metastasi e una ridotta sopravvivenza. SEMA3A sembra infatti inibire l'angiogenesi tumorale e lo sviluppo di metastasi sopprimendo il potenziale di migrazione delle cellule tumorali attraverso i vasi sanguigni disponibili (111). Nel nostro studio, infatti, la densità capillare è risultata essere inversamente correlata all'espressione di SEMA3A; Maione et al (111) hanno dimostrato che SEMA3A esogeno riduce la densità capillare intratumorale e inibisce l'espansione neoplastica, agendo come una barriera per le cellule tumorali metastatiche. In aggiunta, abbiamo scoperto una correlazione negativa tra l'espressione di VEGF e SEMA3A confermando il ruolo di SEMA3A come ligando competitivo per il legame con la neuropilina. Gaur et al. hanno dimostrato che SEMA3A può invertire parzialmente gli effetti causati dal VEGF nelle cellule ematopoietiche e leucemiche andando a competere con VEGF per il legame con i corecettori neuropilina 1- neuropilina 2 al fine di inibire gli effetti mitogenetici del VEGF nelle cellule endoteliali, portando all'apoptosi e all'inibizione della migrazione di linee cellulari derivanti da neoplasia mammaria (112). In effetti, la migrazione delle cellule tumorali sembra essere regolata da un equilibrio tra l'espressione di VEGF e SEMA3A (108). Osada et al. (104) hanno scoperto che il rapporto tra VEGF e SEMA3A era un potente fattore prognostico indipendente in pazienti affette da carcinoma ovarico, suggerendo che l'equilibrio tra questi fattori modulerebbe la proliferazione e la progressione del tumore. In accordo con questi studi, nel nostro lavoro inerente al melanoma cutaneo il rapporto VEGF / SEMA3A è

risultato essere il fattore più strettamente correlato alla presenza o meno di metastasi e alla sopravvivenza: i pazienti con alto rapporto hanno mostrato una prognosi significativamente più sfavorevole rispetto a quelli con un basso rapporto VEGF/SEMA3A.

CONCLUSIONE

In conclusione, l'espressione di SEMA3A e il rapporto tra VEGF e SEMA3A si sono rivelati preziosi biomarcatori prognostici per i pazienti affetti da melanoma cutaneo, in particolare per i pazienti affetti da melanoma cutaneo con spessore di Breslow > di 1 mm. Inoltre i nostri risultati confermano che SEMA3A, antagonizzando gli effetti mediati da VEGF-A tra cui soprattutto l'aumento intratumorale del numero di capillari, potrebbe essere candidato come soppressore tumorale e potrebbe diventare una molecola target per una nuova terapia per il trattamento del melanoma cutaneo, anche in combinazioni con altre terapie.

BIBLIOGRAFIA

- 1) **Giannetti A.** *Trattato di dermatologia, volume IV-genodermatosi e dermatologia oncologica.* II edizione. Padova. Piccin Nuova Libreria.2002
- 2) **Fabrizi G.** *Dermatologia pediatrica,* I edizione. Milano. Masson. 2004
- 3) **Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM).** *Linee guida Melanoma -2019 (2019)*
- 4) **Caligaris Cappio F.** *Oncologia medica in Rugarli medicina interna sistematica,* settima edizione. Milano. Edra Masson. 2015
- 5) **Associazione Italiana Registri Tumori AIRTUM & Associazione Italiana di Oncologia medica AIOM.** *I numeri del cancro in Italia -2019 (2019)*
- 6) **Atlante Registro Tumori Regione Marche** *Rapporto tumori anni 2010-2012- 1° rapporto sui tumori maligni con dati di incidenza e di mortalità*
- 7) **Kumar V, Abbas A.K, Fausto N, Aster J.C Robbins e Cotran-Le basi patologiche delle malattie, volume II,** 8° edizione, Milano, Edra edizioni. 2014
- 8) **Eckertle Mize D, Bishop M, Resse E, et al.** *Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrome.* In: Riegert-Johnson DL, Boardman LA, Hefferon T, et al., *Cancer Syndromes.* Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2009.
- 9) **Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC.** *The melanomas: a synthesis of epidemiological,clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes,causal pathways, and cells of origin.,* *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011 Oct;24(5):879-97.
- 10) **Rastrelli M, Tropea S, Rossi C.R & Alaiba M.** *Melanoma: Epidemiology, Risk Factors,Pathogenesis, Diagnosis and Classification* *Melanoma and Sarcoma Unit, Veneto Institute of Oncology, IOV- IRCCS, Padova, Italy; Melanoma and Sarcoma Unit, Veneto Institute of Oncology, IOV-IRCCS and Department of Surgery, Oncology and Gastroenterology, University of Padova, Padova, Italy; Dermatology Unit, University of Padova, Padova, Italy.* 1005-1012 (2014)
- 11) **Pu Zhang, Chris Goodrich, Changliang Fu, Cheng Dong** *Melanoma upregulates ICAM-1 expression on endothelial cells through engagement of tumor CD44 with endothelial E-selectin and activation of a PKC α -p38-SP-1 pathway* 2014 Nov; 28(11): 4591–4609. doi: 10.1096/fj.11-202747
- 12) **Gilli Galore-Haskel, Erez N. Baruch, Amy L. Berg, Iris Barshack, Itzhak Zilinsky, Camila Avivi, Michal J. Besser, Jacob Schachter, Gal Markel** *Histopathological expression analysis of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) along development and progression of human melanoma.* *Oncotarget.* 2017 Nov 21; 8(59): 99580–99586. Published online 2017 Sep 14. doi: 10.18632/oncotarget.20884
- 13) **Esmeralda Carrillo, José Prados, Juan Antonio Marchal, Houria Boulaiz, Antonio Martínez, Fernando Rodríguez-Serrano, Octavio Caba, Salvio Serrano, Antonia Aránega** *Prognostic Value of RT-PCR Tyrosinase Detection in Peripheral Blood of Melanoma Patients* *Dis Markers.* 2006; 22(3): 175–181. Published online 2006 Jun 15. doi: 10.1155/2006/462065 PMCID: PMC3851109
- 14) **Ichiro Yajima, Mayuko Y. Kumasaka, Nguyen Dinh Thang, Yuji Goto, Kozue Takeda, Osamu Yamanoshita, Machiko Iida, Nobutaka Ohgami, Haruka Tamura, Yoshiyuki Kawamoto, Masashi Kato** *RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy* *Dermatol Res Pract.* 2012; 2012: 354191. Published online 2011 Oct 12. doi: 10.1155/2012/354191
- 15) **Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T et al.;** *Distinct sets of genetic alterations in melanoma.,* *N Engl J Med.* 2005 Nov 17;353(20):2135-47.
- 16) **Kumar V, Abbas A.K, Fausto N, Aster J.C Robbins e Cotran-Le basi patologiche delle malattie, volume I,** 8° edizione, Milano, Edra edizioni. 2014
- 17) **William Bruno, Claudia Martinuzzi, Virginia Andreotti, Lorenza Pastorino, Francesco Spagnolo, Bruna Dalmasso, Francesco Cabiddu, Marina Gualco, Alberto Ballestrero, Giovanna Bianchi-Scarrà, Paola Queirolo, Federica Grillo, Luca Mastracci, Paola Ghiorzo,** *Heterogeneity and frequency of BRAF mutations in primary melanoma: Comparison between molecular methods and immunohistochemistry on behalf of the Italian Melanoma*

Intergroup (IMI) Oncotarget. 2017 Jan 31; 8(5): 8069–8082. Published online 2016 Dec 21. doi: 10.18632/oncotarget.14094

- 18) **Molly H. Jenkins, Constance E. Brinckerhoff, David W.** *CXCR3 Signaling in BRAFWT Melanoma Increases IL-8 Expression and Tumorigenicity* Mullins PLoS One. 2015; 10(3): e0121140. Published online 2015 Mar 23. doi: 10.1371/journal.pone.0121140
- 19) **Mariusz L Hartman , Michal Rozanski , Marta Osrodek , Izabela Zalesna , Malgorzata Czyz** *Vemurafenib and trametinib reduce expression of CTGF and IL-8 in ^{V600E} BRAF melanoma cells* Lab Invest 2017 Feb;97(2):217-227. doi: 10.1038/labinvest.2016.140. Epub 2017 Jan 9
- 20) **Giulia C. Leonardi, Luca Falzone, Rossella Salemi, Antonino Zanghi, Demetrios A. Spandidos, James A. McCubrey, Saverio Candido, Massimo Libra** *Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review)* Int J Oncol. 2018 Apr; 52(4): 1071–1080. Published online 2018 Feb 27. doi: 10.3892/ijo.2018.4287
- 21) **Ryan J Sullivan, David E Fisher** *Understanding the biology of melanoma and therapeutic implications* Hematol Oncol Clin North Am. Author manuscript; available in PMC 2015 Jun 1. Published in final edited form as: Hematol Oncol Clin North Am. 2014 Jun; 28(3): 437–453. doi: 10.1016/j.hoc.2014.02.007
- 22) **Debina Sarkar, Euphemia Y Leung, Bruce C Baguley, Graeme J Finlay, Marjan E Askarian-Amiri** *Epigenetics Epigenetic regulation in human melanoma: past and future.* 2015 Feb; 10(2): 103–121. Published online 2015 Jan 14. doi: 10.1080/15592294.2014.1003746
- 23) **Elizabeth J. Davis, Douglas B. Johnson, Jeffrey A. Sosman, Sunandana Chandra** *Melanoma: What do all the mutations mean?* Cancer. Author manuscript; available in PMC 2019 Sep 1. Published in final edited form as: Cancer. 2018 Sep 1; 124(17): 3490–3499. Published online 2018 Apr 17. doi: 10.1002/cncr.31345
- 24) **Saro Sarkisian, Diwakar Davar** *Drug Des Devel Ther MEK inhibitors for the treatment of NRAS mutant melanoma.* 2018; 12: 2553–2565. Published online 2018 Aug 20. doi: 10.2147/DDDT.S131721
- 25) **Markus V. Heppt, Timo Siepmann, Jutta Engel, Gabriele Schubert-Fritschle, Renate Eckel, Laura Mirlach, Thomas Kirchner, Andreas Jung, Anja Gesierich, Thomas Ruzicka, Michael J. Flaig, Carola Berking** *Prognostic significance of BRAF and NRAS mutations in melanoma: a German study from routine care* BMC Cancer. 2017; 17: 536. Published online 2017 Aug 10. doi: 10.1186/s12885-017-3529-5
- 26) **Inna V. Fedorenko, Geoffrey T. Gibney, Keiran S. M. Smalley** *NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management* Author manuscript; available in PMC 2014 Apr 8. Published in final edited form as: Oncogene. 2013 Jun 20; 32(25): 3009–3018. Published online 2012 Oct 15. doi: 10.1038/onc.2012.453
- 27) **Maria Colombino, Amelia Lissia, Mariaelena Capone, Vincenzo De Giorgi, Daniela Massi, Ignazio Stanganelli, Ester Fonsatti, Michele Maio, Gerardo Botti, Corrado Caracò, Nicola Mozzillo, Paolo A Ascierto, Antonio Cossu, Giuseppe Palmieri** *Heterogeneous distribution of BRAF/NRAS mutations among Italian patients with advanced melanoma* J Transl Med. 2013; 11: 202. Published online 2013 Aug 29. doi: 10.1186/1479-5876-11-202
- 28) **Ana Slipicevic, Meenhard Herlyn** *J Invest Dermatol. KIT in Melanoma: Many Shades of Gray* Author manuscript; available in PMC 2016 Feb 1. Published in final edited form as: J Invest Dermatol. 2015 Feb; 135(2): 337–338. doi: 10.1038/jid.2014.417
- 29) **Paul W. Sperduto, Wen Jiang, Paul D. Brown, Steve Braunstein, Penny Sneed, Daniel A. Wattson, Helen A. Shih, Ananta Bangdiwala, Ryan Shanley, Natalie A. Lockney, Kathryn Beal, Emil Lou, Thomas Amatruda, William A. Sperduto, John P. Kirkpatrick,**

- Norman Yeh, Laurie E. Gaspar, Jason K. Molitoris, Laura Masucci, David Roberge, James Yu, Veronica Chiang, Minesh Mehta** *The Prognostic Value of BRAF, C-KIT, and NRAS Mutations in Melanoma Patients With Brain Metastases*. Author manuscript; available in PMC 2019 Dec 21. Published in final edited form as: *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2017 Aug 1; 98(5): 1069–1077. Published online 2017 Mar 29. doi: 10.1016/j.ijrobp.2017.03.030
- 30) **Andressa Germano Leonardo Cardili Fernando Cintra Lopes Carapeto and Gilles Landman** *BRAFV600E and KIT immunoexpression in early-stage melanoma* *An Bras Dermatol*. 2019 Jul-Aug; 94(4): 458–460. doi: 10.1590/abd1806-4841.20198349
 - 31) **Pilloni, P. Bianco, E. Difelice, S. Cabras, M.E. Castellanos, L. Atzori, C. Ferreli, P. Mulas, S. Nemolato, G. Faa Eur J Histochem** *The usefulness of c-Kit in the immunohistochemical assessment of melanocytic*. 2011 Apr 1; 55(2): e20. Published online 2011 Jun 7. doi: 10.4081/ejh.2011.e20
 - 32) **Scott E. Woodman, Michael A. Davies** *Targeting KIT in Melanoma: A Paradigm of Molecular Medicine and Targeted Therapeutics*. Author manuscript; available in PMC 2014 Feb 26. Published in final edited form as: *Biochem Pharmacol*. 2010 Sep 1; 80(5): 568–574. Published online 2010 May 8. doi: 10.1016/j.bcp.2010.04.032
 - 33) **Maija Kiuru, Klaus J. Busam** *The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma* *Lab Invest*. Author manuscript; available in PMC 2017 Aug 1. Published in final edited form as: *Lab Invest*. 2017 Feb; 97(2): 146–157. Published online 2017 Jan 9. doi: 10.1038/labinvest.2016.142 PMCID: PMC5413358
 - 34) **Thomas Wiesner, Maija Kiuru, Sasinya N. Scott, Maria Arcila, Allan C. Halpern, Travis Hollmann, Michael F. Berger, Klaus J. Busam** *NF1 Mutations are Common in Desmoplastic Melanoma*. Author manuscript; available in PMC 2016 Oct 1. Published in final edited form as: *Am J Surg Pathol*. 2015 Oct; 39(10): 1357–1362. doi: 10.1097/PAS.0000000000000451 PMCID: PMC5037960
 - 35) **Chung-Young Kim, Dae Won Kim, Kevin Kim, Jonathan Curry, Carlos Torres-Cabala** *GNAQ mutation in a patient with metastatic mucosal melanoma*, Sapna Patel *BMC Cancer*. 2014; 14: 516. Published online 2014 Jul 16. doi: 10.1186/1471-2407-14-516 PMCID: PMC4223398
 - 36) **Oscar Urtatiz, Catherine D. Van Raamsdonk** *Gnaq and Gnal1 in the Endothelin Signaling Pathway and Melanoma* *Front Genet*. 2016; 7: 59. Published online 2016 Apr 20. doi: 10.3389/fgene.2016.00059 PMCID: PMC4837292
 - 37) **Colin R. Goding, Heinz Arnheiter** *MITF—the first 25 years* *Genes Dev*. 2019 Aug 1; 33(15-16): 983–1007. doi: 10.1101/gad.324657.119 PMCID: PMC6672050
 - 38) **Mariusz L. Hartman, Malgorzata Czyz** *MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity* *Cell Mol Life Sci*. 2015; 72(7): 1249–1260. Published online 2014 Nov 30. doi: 10.1007/s00018-014-1791-0 PMCID: PMC43634857
 - 39) **Adam I. Riker** *Melanoma a modern multidisciplinary approach* Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018
 - 40) **Dummer R, Hauschild A, Lindenblatt N.** *Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.*; *Ann Oncol*; 2015; 26 (suppl 5): v126-v132;
 - 41) **Marghoob NG, Liopyris K, Jaimes N.** *Dermoscopy: A Review of the Structures That Facilitate Melanoma Detection*. *J Am Osteopath Assoc*. 2019 Jun 1; 119(6):380-390. doi: 10.7556/jaoa.2019.067. PMID: 31135866.
 - 42) **Adler NR, Kelly JW, Guitera P, Menzies SW, Chamberlain AJ, Fishburn P, Button-Sloan AE, Heal C, Soyer HP, Thompson JF.** *Methods of melanoma detection and of skin monitoring for individuals at high risk of melanoma: new Australian clinical practice*. *Med J Aust*. 2019 Jan; 210(1):41-47. doi: 10.5694/mja2.12033. Epub 2018 Dec 2. PMID: 30636296.

- 43) **Gonzalez A.** *Sentinel Lymph Node Biopsy: Past and Present Implications for the Management of Cutaneous Melanoma with Nodal Metastasis.* Am J Clin Dermatol. 2018 Nov;19(Suppl 1):24-30. doi: 10.1007/s40257-018-0379-0. PMID: 30374897; PMCID: PMC6244615.
- 44) **Falk Delgado A, Zommorodi S, Falk Delgado A.** *Sentinel Lymph Node Biopsy and Complete Lymph Node Dissection for Melanoma.* Curr Oncol Rep. 2019 Apr 26;21(6):54. doi: 10.1007/s11912-019-0798-y. PMID: 31028497; PMCID: PMC6486528.
- 45) AJCC CANCER STAGING MANUAL Seventh Edition
- 46) **Michielin O, van Akkooi ACJ, Ascierto PA, Dummer R, Keilholz U;** ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. *Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.* Ann Oncol. 2019 Dec 1;30(12):1884-1901. doi: 10.1093/annonc/mdz411. PMID: 31566661.
- 47) **Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Nieweg OE, Roses DF, Hoekstra HJ, Karakousis CP, Puleo CA, Coventry BJ, Kashani-Sabet M, Smithers BM, Paul E, Kraybill WG, McKinnon JG, Wang HJ, Elashoff R, Faries MB; MSLT Group.** *Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma.* N Engl J Med. 2014 Feb 13;370(7):599-609. doi: 10.1056/NEJMoa1310460. PMID: 24521106; PMCID: PMC4058881.
- 48) **Eggermont AM, Chiarion-Sileni V, Grob JJ, Dummer R, Wolchok JD, Schmidt H, Hamid O, Robert C, Ascierto PA, Richards JM, Lebbé C, Ferraresi V, Smylie M, Weber JS, Maio M, Konto C, Hoos A, de Pril V, Gurunath RK, de Schaetzen G, Suciu S, Testori A.** *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 May;16(5):522-30. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70122-1. Epub 2015 Mar 31. Erratum in: Lancet Oncol. 2015 Jun;16(6):e262. Erratum in: Lancet Oncol. 2016 Jun;17(6):e223. PMID: 25840693.
- 49) **Ascierto PA, Borgognoni L, Botti G, Guida M, Marchetti P, Mocellin S, Muto P, Palmieri G, Patuzzo R, Quagliano P, Stanganelli I, Caracò C.** *New paradigm for stage III melanoma: from surgery to adjuvant treatment.* J Transl Med. 2019 Aug 14;17(1):266. doi: 10.1186/s12967-019-2012-2. Erratum in: J Transl Med. 2019 Sep 18;17(1):315. PMID: 31412885; PMCID: PMC6693227.
- 50) **Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, Gogas HJ, Arance AM, Cowey CL, Dalle S, Schenker M, Chiarion-Sileni V, Marquez-Rodas I, Grob JJ, Butler MO, Middleton MR, Maio M, Atkinson V, Queirolo P, Gonzalez R, Kudchadkar RR, Smylie M, Meyer N, Mortier L, Atkins MB, Long GV, Bhatia S, Lebbé C, Rutkowski P, Yokota K, Yamazaki N, Kim TM, de Pril V, Sabater J, Qureshi A, Larkin J, Ascierto PA; CheckMate 238 Collaborators.** *Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma.* N Engl J Med. 2017 Nov 9;377(19):1824-1835. doi: 10.1056/NEJMoa1709030. Epub 2017 Sep 10. PMID: 28891423.
- 51) **Yokota K, Uchi H, Uhara H, Yoshikawa S, Takenouchi T, Inozume T, Ozawa K, Ihn H, Fujisawa Y, Qureshi A, de Pril V, Otsuka Y, Weber J, Yamazaki N.** *Adjuvant therapy with nivolumab versus ipilimumab after complete resection of stage III/IV melanoma: Japanese subgroup analysis from the phase 3 CheckMate 238 study.* J Dermatol. 2019 Dec;46(12):1197-1201. doi: 10.1111/1346-8138.15103. Epub 2019 Oct 22. PMID: 31638282; PMCID: PMC6916343.
- 52) **Eggermont AMM, Blank CU, Mandala M, Long GV, Atkinson VG, Dalle S, Haydon A, Lichinitser M, Khattak A, Carlino MS, Sandhu S, Larkin J, Puig S, Ascierto PA, Rutkowski P, Schadendorf D, Koornstra R, Hernandez-Aya L, Di Giacomo AM, van den Eertwegh AJ, Grob JJ, Gutzmer R, Jamal R, Lorigan PC, Lupinacci R, Krepler C, Ibrahim N, Kicinski M, Marreaud S, van Akkooi AC, Suciu S, Robert C.** *Prognostic and*

- predictive value of AJCC-8 staging in the phase III EORTC1325/KEYNOTE-054 trial of pembrolizumab vs placebo in resected high-risk stage III melanoma.* Eur J Cancer. 2019 Jul;116:148-157. doi: 10.1016/j.ejca.2019.05.020. Epub 2019 Jun 11. PMID: 31200321.
- 53) **Kudchadkar RR, Michielin O, van Akkooi ACJ.** *Practice-Changing Developments in Stage III Melanoma: Surgery, Adjuvant Targeted Therapy, and Immunotherapy.* Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2018 May 23;38:759-762. doi: 10.1200/EDBK_200241. PMID: 30231370.
 - 54) **Schadendorf D, Hauschild A, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, Chiarion-Sileni V, Larkin J, Nyakas M, Dutriaux C, Haydon A, Robert C, Mortier L, Lesimple T, Plummer R, Schachter J, Dasgupta K, Manson S, Koruth R, Mookerjee B, Kefford R, Dummer R, Kirkwood JM, Long GV.** *Patient-reported outcomes in patients with resected, high-risk melanoma with BRAFV600E or BRAFV600K mutations treated with adjuvant dabrafenib plus trametinib (COMBI-AD): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial.* Lancet Oncol. 2019 May;20(5):701-710. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30940-9. Epub 2019 Mar 27. PMID: 30928620.
 - 55) **Samlowski WE, Moon J, Witter M, Atkins MB, Kirkwood JM, Othus M, Ribas A, Sondak VK, Flaherty LE.** *High frequency of brain metastases after adjuvant therapy for high-risk melanoma.* Cancer Med. 2017 Nov;6(11):2576-2585. doi: 10.1002/cam4.1223. Epub 2017 Oct 10. PMID: 28994212; PMCID: PMC5673911.
 - 56) **Hodi FS, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Wagstaff J, Dummer R, Ferrucci PF, Smylie M, Hill A, Hogg D, Marquez-Rodas I, Jiang J, Rizzo J, Larkin J, Wolchok JD.** *Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial.* Lancet Oncol. 2018 Nov;19(11):1480-1492. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30700-9. Epub 2018 Oct 22. Erratum in: Lancet Oncol. 2018 Dec;19(12):e668. Erratum in: Lancet Oncol. 2018 Nov;19(11):e581. PMID: 30361170.
 - 57) **Robert C, Ribas A, Schachter J, Arance A, Grob JJ, Mortier L, Daud A, Carlino MS, McNeil CM, Lotem M, Larkin JMG, Lorigan P, Neyns B, Blank CU, Petrella TM, Hamid O, Su SC, Krepler C, Ibrahim N, Long GV.** *Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study.* Lancet Oncol. 2019 Sep;20(9):1239-1251. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30388-2. Epub 2019 Jul 22. PMID: 31345627.
 - 58) **Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, Karaszewska B, Hauschild A, Levchenko E, Chiarion Sileni V, Schachter J, Garbe C, Bondarenko I, Gogas H, Mandalà M, Haanen J, Lebbé C, Mackiewicz A, Rutkowski P, Nathan PD, Ribas A, Davies MA, Flaherty KT, Burgess P, Tan M, Gasal E, Voi M, Schadendorf D, Long GV.** *Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma.* N Engl J Med. 2019 Aug 15;381(7):626-636. doi: 10.1056/NEJMoa1904059. Epub 2019 Jun 4. PMID: 31166680.
 - 59) **Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Di Giacomo AM, Mandalà M, Demidov L, Stroyakovskiy D, Thomas L, de la Cruz-Merino L, Dutriaux C, Garbe C, Yan Y, Wongchenko M, Chang I, Hsu JJ, Koralek DO, Rooney I, Ribas A, Larkin J.** *Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial.* Lancet Oncol. 2016 Sep;17(9):1248-60. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30122-X. Epub 2016 Jul 30. PMID: 27480103.
 - 60) **Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, Arance A, Mandalà M, Liskay G, Garbe C, Schadendorf D, Krajsova I, Gutzmer R, Chiarion-Sileni V, Dutriaux C, de Groot JWB, Yamazaki N, Loquai C, Moutouh-de Parseval LA, Pickard MD, Sandor V, Robert C, Flaherty KT.** *Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3*

trial. Lancet Oncol. 2018 May;19(5):603-615. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30142-6. Epub 2018 Mar 21. PMID: 29573941.

- 61) **Dummer R, Schadendorf D, Ascierto PA, Arance A, Dutriaux C, Di Giacomo AM, Rutkowski P, Del Vecchio M, Gutzmer R, Mandala M, Thomas L, Demidov L, Garbe C, Hogg D, Liskay G, Queirolo P, Wasserman E, Ford J, Weill M, Sirulnik LA, Jehl V, Bozón V, Long GV, Flaherty K.** *Binimetinib versus dacarbazine in patients with advanced NRAS-mutant melanoma (NEMO): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial.* Lancet Oncol. 2017 Apr;18(4):435-445. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30180-8. Epub 2017 Mar 9. PMID: 28284557.
- 62) **Gondi V, Pugh SL, Tome WA, Caine C, Corn B, Kanner A, Rowley H, Kundapur V, DeNittis A, Greenspoon JN, Konski AA, Bauman GS, Shah S, Shi W, Wendland M, Kachnic L, Mehta MP.** *Preservation of memory with conformal avoidance of the hippocampal neural stem-cell compartment during whole-brain radiotherapy for brain metastases (RTOG 0933): a phase II multi-institutional trial.* J Clin Oncol. 2014 Dec 1;32(34):3810-6. doi: 10.1200/JCO.2014.57.2909. Epub 2014 Oct 27. PMID: 25349290; PMCID: PMC4239303.
- 63) **Davies MA, Saiag P, Robert C, Grob JJ, Flaherty KT, Arance A, Chiarion-Sileni V, Thomas L, Lesimple T, Mortier L, Moschos SJ, Hogg D, Márquez-Rodas I, Del Vecchio M, Lebbé C, Meyer N, Zhang Y, Huang Y, Mookerjee B, Long GV.** *Dabrafenib plus trametinib in patients with BRAF^{V600}-mutant melanoma brain metastases (COMBI-MB): a multicentre, multicohort, open-label, phase 2 trial.* Lancet Oncol. 2017 Jul;18(7):863-873. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30429-1. Epub 2017 Jun 4. PMID: 28592387; PMCID: PMC5991615.
- 64) **Tawbi HA, Forsyth PA, Algazi A, Hamid O, Hodi FS, Moschos SJ, Khushalani NI, Lewis K, Lao CD, Postow MA, Atkins MB, Ernstoff MS, Reardon DA, Puzanov I, Kudchadkar RR, Thomas RP, Tarhini A, Pavlick AC, Jiang J, Avila A, Demelo S, Margolin K.** *Combined Nivolumab and Ipilimumab in Melanoma Metastatic to the Brain.* N Engl J Med. 2018 Aug 23;379(8):722-730. doi: 10.1056/NEJMoa1805453. PMID: 30134131.
- 65) **Schwartz LH, Litière S, de Vries E, Ford R, Gwyther S, Mandrekar S, Shankar L, Bogaerts J, Chen A, Dancey J, Hayes W, Hodi FS, Hoekstra OS, Huang EP, Lin N, Liu Y, Therasse P, Wolchok JD, Seymour L.** *RECIST 1.1-Update and clarification: From the RECIST committee.* Eur J Cancer. 2016 Jul;62:132-7. doi: 10.1016/j.ejca.2016.03.081. Epub 2016 May 14. PMID: 27189322; PMCID: PMC5737828.
- 66) **Litière S, Collette S, de Vries EG, Seymour L, Bogaerts J.** *RECIST - learning from the past to build the future.* Nat Rev Clin Oncol. 2017 Mar;14(3):187-192. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.195. Epub 2016 Dec 20. PMID: 27995946.
- 67) **Seymour L, Bogaerts J, Perrone A, Ford R, Schwartz LH, Mandrekar S, Lin NU, Litière S, Dancey J, Chen A, Hodi FS, Therasse P, Hoekstra OS, Shankar LK, Wolchok JD, Ballinger M, Caramella C, de Vries EGE; RECIST working group.** *iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics.* Lancet Oncol. 2017 Mar;18(3):e143-e152. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30074-8. Epub 2017 Mar 2. Erratum in: Lancet Oncol. 2019 May;20(5):e242. PMID: 28271869; PMCID: PMC5648544.
- 68) **Le Lay J, Jarraya H, Lebellec L, Penel N.** *irRECIST and iRECIST: the devil is in the details.* Ann Oncol. 2017 Jul 1;28(7):1676-1678. doi: 10.1093/annonc/mdx168. PMID: 28383646.
- 69) **Deckers EA, Hoekstra-Weebers JEHM, Damude S, Francken AB, Ter Meulen S, Bastiaannet E, Hoekstra HJ.** *The MELFO Study: A Multicenter, Prospective, Randomized Clinical Trial on the Effects of a Reduced Stage-Adjusted Follow-Up Schedule on Cutaneous Melanoma IB-IIC Patients-Results After 3 Years.* Ann Surg Oncol. 2020 May;27(5):1407-

1417. doi: 10.1245/s10434-019-07825-7. Epub 2019 Sep 18. PMID: 31535302; PMCID: PMC7138761.
- 70) **Alto LT, Terman JR.** *Semaphorins and their Signaling Mechanisms.* Methods Mol Biol. 2017;1493:1-25. doi: 10.1007/978-1-4939-6448-2_1. PMID: 27787839; PMCID: PMC5538787.
 - 71) **Franzolin G, Tamagnone L.** *Semaphorin Signaling in Cancer-Associated Inflammation.* Int J Mol Sci. 2019 Jan 17;20(2):377. doi: 10.3390/ijms20020377. PMID: 30658382; PMCID: PMC6358995.
 - 72) **Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M.** *Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification.* In Vivo 2014; 28:1005–1011.
 - 73) **Mimeault M, Batra SK.** *Novel biomarkers and therapeutic targets for optimizing the therapeutic management of melanomas.* World J Clin Oncol 2012; 3:32–42.
 - 74) **Balch CM, Balch GC, Sharma RR.** *Identifying early melanomas at higher risk for metastases.* J Clin Oncol 2012; 30:1406–1407.
 - 75) **Homsi J, Kashani-Sabet M, Messina JL, Daud A.** *Cutaneous melanoma: prognostic factors.* Cancer Control 2005; 12:223–229.
 - 76) **Criscione VD, Weinstock MA.** *Melanoma thickness trends in the United States, 1988-2006.* J Invest Dermatol 2010; 130:793–797.
 - 77) **Bartlett EK, Karakousis GC.** *Current staging and prognostic factors in melanoma.* Surg Oncol Clin N Am 2015; 24:215–227.
 - 78) **Donovan P, Patel J, Dight J, Wong HY, Sim SL, Murigneux V, et al.** *Endovascular progenitors infiltrate melanomas and differentiate towards a variety of vascular beds promoting tumor metastasis.* Nat Commun 2019; 10:18.
 - 79) **Zachary I.** *Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor.* Am J Physiol Cell Physiol 2001; 280:C1375–C1386.
 - 80) **Simonetti O, Lucarini G, Brancorsini D, Nita P, Bernardini ML, Biagini G, Offidani A.** *Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanocytic lesions.* Cancer 2002; 95:1963–1970.
 - 81) **Alessi C, Scapulatempo Neto C, Viana CR, Vazquez VL.** *PD-1/PD-L1 and VEGF-A/VEGF-C expression in lymph node microenvironment and association with melanoma metastasis and survival.* Melanoma Res 2017; 27:565–572.
 - 82) **Felcht M, Thomas M.** *Angiogenesis in malignant melanoma.* J Dtsch Dermatol Ges 2015; 13:125–136.
 - 83) **Ronca M, Benkheil S, Mitola S, Struyf S, Liekens S.** *Tumor angiogenesis revisited: regulators and clinical implications.* Med Res Rev 2017; 37:1231–1274.
 - 84) **Staton CA.** *Class 3 semaphorins and their receptors in physiological and pathological angiogenesis.* Biochem Soc Trans 2011; 39:1565–1570.
 - 85) **Tamagnone L, Comoglio PM.** *Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond.* Trends Cell Biol 2000; 10:377–383.
 - 86) **Chakraborty G, Kumar S, Mishra R, Patil TV, Kundu GC.** *Semaphorin 3A suppresses tumor growth and metastasis in mice melanoma model.* PLoS One 2012; 7:e33633.
 - 87) **Simonetti O, Goteri G, Lucarini G, Filosa A, Pieramici T, Rubini C, et al.** *Potential role of CCL27 and CCR10 expression in melanoma progression and immune escape.* Eur J Cancer 2006; 42:1181–1187.
 - 88) **Lever WF, Schaumburg-Lever G.** *Histopathology of the skin.* Philadelphia, PA: J.B. Lippincott; 1990.
 - 89) **Gupta GP, Massagué J.** *Cancer metastasis: building a framework.* Cell 2006; 127:679–695.

- 90) Spatz A, Stock N, Batist G, van Kempen LC. *The biology of melanoma prognostic factors*. Discov Med 2010; 10:87–93.
- 91) White RR, Stanley WE, Johnson JL, Tyler DS, Seigler HF. *Long-term survival in 2,505 patients with melanoma with regional lymph node metastasis*. Ann Surg 2002; 235:879–887.
- 92) Pontikes LA, Temple WJ, Cassar SL, Lafrenière R, Huchcroft SA, Jerry LM, et al. *Influence of level and depth on recurrence rate in thin melanomas*. Am J Surg 1993; 165:225–228.
- 93) Martínez-García MÁ, Riveiro-Falkenbach E, Rodríguez-Peralto JL, Nagore E, Martorell-Calatayud A, Campos-Rodríguez F, et al.; Spanish Sleep Network. *A prospective multicenter cohort study of cutaneous melanoma: clinical staging and potential associations with HIF-1 α and VEGF expressions*. Melanoma Res 2017; 27:558–564.
- 94) Chua R, Setzer S, Govindarajan B, Sexton D, Cohen C, Arbiser JL. *Maspin expression, angiogenesis, prognostic parameters, and outcome in malignant melanoma*. J Am Acad Dermatol 2009; 60:758–766.
- 95) Rajabi P, Neshat A, Mokhtari M, Rajabi MA, Eftekhari M, Tavakoli P. *The role of VEGF in melanoma progression*. J Res Med Sci 2012; 17:534–539.
- 96) Pastushenko I, Vermeulen PB, Carapeto FJ, Van den Eynden G, Rutten A, Ara M, et al. *Blood microvessel density, lymphatic microvessel density and lymphatic invasion in predicting melanoma metastases: systematic review and meta-analysis*. Br J Dermatol 2014; 170:66–77.
- 97) Ferrara N, Adamis AP. *Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy*. Nat Rev Drug Discov 2016; 15:385–403.
- 98) Grignol VP, Olencki T, Relekar K, Taylor C, Kibler A, Kefauver C, et al. *A phase 2 trial of bevacizumab and high-dose interferon alpha 2B in metastatic melanoma*. J Immunother 2011; 34:509–515.
- 99) Varker KA, Biber JE, Kefauver C, Jensen R, Lehman A, Young D, et al. *A randomized phase 2 trial of bevacizumab with or without daily low-dose interferon alfa-2b in metastatic malignant melanoma*. Ann Surg Oncol 2007; 14:2367–2376.
- 100) Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. *Basic and therapeutic aspects of angiogenesis*. Cell 2011; 146:873–887.
- 101) Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. *Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor*. Cell 1998; 92:735–745.
- 102) Bielenberg DR, Klagsbrun M. *Targeting endothelial and tumor cells with semaphorins*. Cancer Metastasis Rev 2007; 26:421–431.
- 103) Guttmann-Raviv N, Shrager-Heled N, Varshavsky A, Guimaraes-Sternberg C, Kessler O, Neufeld G. *Semaphorin-3A and semaphorin-3F work together to repel endothelial cells and to inhibit their survival by induction of apoptosis*. J Biol Chem 2007; 282:26294–26305.
- 104) Osada R, Horiuchi A, Kikuchi N, Ohira S, Ota M, Katsuyama Y, Konishi I. *Expression of semaphorins, vascular endothelial growth factor, and their common receptor neuropilins and allelic loss of semaphorin locus in epithelial ovarian neoplasms: increased ratio of vascular endothelial growth factor to semaphorin is a poor prognostic factor in ovarian carcinomas*. Hum Pathol 2006; 37:1414–1425.
- 105) Tang C, Gao X, Liu H, Jiang T, Zhai X. *Decreased expression of SEMA3A is associated with poor prognosis in gastric carcinoma*. Int J Clin Exp Pathol 2014; 7:4782–4794.
- 106) Herman JG, Meadows GG. *Increased class 3 semaphorin expression modulates the invasive and adhesive properties of prostate cancer cells*. Int J Oncol 2007; 30:1231–1238.
- 107) Kigel B, Varshavsky A, Kessler O, Neufeld G. *Successful inhibition of tumor development by specific class-3 semaphorins is associated with expression of appropriate semaphorin receptors by tumor cells*. PLoS One 2008; 3:e3287.

- 108)Bachelder RE, Lipscomb EA, Lin X, Wendt MA, Chadborn NH, Eickholt BJ, Mercurio AM.** *Competing autocrine pathways involving alternative neuropilin-1 ligands regulate chemotaxis of carcinoma cells.* Cancer Res 2003; 63:5230–5233.
- 109)Bagnard D, Vaillant C, Khuth ST, Dufay N, Lohrum M, Puschel AW, et al.** *Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor.* J Neurosci 2001; 21:3332–3341.
- 110)Mazurek AM, Olbryt M.** *The influence of neuropilin-1 silencing on semaphorin 3A and 3C activity in B16(F10) murine melanoma cells.* Neoplasma 2012; 59:43–51.
- 111)Maione F, Molla F, Meda C, Latini R, Zentilin L, Giacca M, et al.** *Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models.* J Clin Invest 2009; 119:3356–3372.
- 112)Gaur P, Bielenberg DR, Samuel S, Bose D, Zhou Y, Gray MJ, et al.** *Role of class 3 semaphorins and their receptors in tumor growth and angiogenesis.* Clin Cancer Res 2009; 15:6763–6770.