



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

Dottorato di Ricerca in Salute dell'Uomo

Ciclo XXXIII

**MELANOMA E TESSUTO ADIPOSO
PERITUMORALE:
STUDIO PRELIMINARE SUL
RUOLO DELLE ADIPOCITOCHINE
NELLA CARATTERIZZAZIONE
E PROGNOSI DI MALATTIA**

Relatore: Chiar.ma

**Prof.ssa Annamaria
Offidani**

Tesi di Dottorato di

Dott.ssa Elisa Molinelli

A.A. 2019/2020

INDICE

Abstract.....	p.3
Introduzione.....	p.5
IL MELANOMA	
• Epidemiologia.....	p.8
• Fattori di rischio.....	p.13
• Patogenesi e biologia molecolare.....	p.27
• Classificazione molecolare del melanoma.....	p.37
• Precursori e caratteristiche cliniche.....	p.40
• Aspetti anatomico-patologici e fattori prognostici.....	p.47
• Diagnosi.....	p.62
• Escissione della lesione primitiva.....	p.64
• Stadiazione.....	p.65
• Terapia e follow-up.....	p.68
TESSUTO ADIPOSO SOTTOCUATENO	
• Struttura, caratteristiche ed espressione citochimica.....	p.86
STUDIO SPERIMENTALE	
• Obiettivi dello studio.....	p.100
• Materiali e metodi.....	p.102
• Risultati.....	p.108
• Discussione.....	p.145
• Conclusioni.....	p.156
BIBLIOGRAFIA.....	p.157

ABSTRACT

Nelle ultime decadi, è andato delineandosi il concetto di organo adiposo, conferendo al tessuto adiposo una funzione endocrina attiva espletata mediante la secrezione di molteplici citochine e chemochine. Queste sembrano detenere infatti un ruolo chiave non solo nel mantenimento dell'omeostasi energetica ma anche nella patogenesi di malattie metaboliche ed infiammatorie e nella crescita e progressione di numerose neoplasie tra le quali il melanoma.

In questo studio sperimentale preliminare abbiamo analizzato l'espressione, a livello del tessuto adiposo sottocutaneo peritumorale mediante qPCR, delle principali adipocitochine (Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-alpha), Interleukin-6 (IL-6), Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI1), Leptina (LEP), Insulin-like Growth factor 1 (IGF1), Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A), Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), C-X-C Motif Chemokine Ligand 1 (CXCL1) e C-X-C Motif Chemokine Ligand 8 (CXCL8)) ritenute coinvolte, sulla base dei dati presenti in letteratura, nei processi di cancerogenesi e metastatizzazione. Lo studio è stato condotto prendendo in analisi una popolazione composta da pazienti affetti da melanoma, confrontando i dati ottenuti con l'espressione delle stesse citochine nel tessuto adiposo sottocutaneo in 2 gruppi controllo composti rispettivamente da nevi melanocitari e cisti epidemoidi. Abbiamo correlato i risultati ottenuti con i principali fattori prognostici di malattia per comprendere la loro espressione in relazione alla severità di patologia.

Abbiamo osservato un aumento statisticamente significativo dell'espressione di PAI1, NAMPT, LEP e CXCL1 a livello del tessuto peritumorale dei campioni di melanoma rispetto ai gruppi controlli ed una correlazione degli stessi con lo stadio patologico di malattia ed in particolare con lo spessore di Breslow (il fattore prognostico più importante nella stadiazione patologica di melanoma).

Il limite principale dello studio è rappresentato dal fatto che la popolazione risulta composta da un numero esiguo di pazienti. Studi su casistiche più ampie saranno necessari per confermare i risultati parziali ottenuti.

Nel complesso, i risultati preliminari di questo lavoro evidenziano che la sovraespressione di alcune adipochine e chemochine in particolare PAI1, NAMPT, LEP e CXCL1 non solo a livello della lesione melanomatosa ma anche nel tessuto adiposo peritumorale può rappresentare un evento chiave nella crescita e soprattutto nell'aggressività locale della neoplasia e apre pertanto l'ipotesi di un ruolo oncogenico diretto di queste molecole e del tessuto adiposo sottocutaneo nella tumoregenesi del melanoma.

ABSTRACT

In the last decades, the concept of adipose organ has emerged, giving adipose tissue an active endocrine function carried out through the secretion of multiple cytokines and chemokines having a key role not only in maintaining energy homeostasis but also in the pathogenesis of metabolic and inflammatory diseases and in the growth and progression of numerous neoplasms including melanoma.

In this preliminary experimental study, we analyzed the expression in the peritumor subcutaneous adipose tissue by qPCR of the most significant adipocytokines involved in the processes of carcinogenesis and metastasis such as Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-alpha), Interleukin- 6 (IL-6), Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI1), Leptin (LEP), Insulin-like Growth factor 1 (IGF1), Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A), Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), CXC Motif Chemokine Ligand 1 (CXCL1) and CXC Motif Chemokine Ligand 8 (CXCL8) in a population of melanoma patients by comparing the data obtained with the expression of the same cytokines in the subcutaneous adipose tissue of 2 control groups composed respectively of melanocytic nevi and epidemoid cysts. We correlated the results obtained with the main disease prognostic factors to understand their expression in relation to the severity of the disease.

We observed a statistically significant increase in the expression of PAI1, NAMPT, LEP and CXCL1 at the level of the peritumor tissue of the melanoma samples compared to the control groups and a correlation of the same with the pathological stage of the disease and in particular with the Breslow thickness (the most important prognostic factor in the pathological staging of melanoma).

The main limitation of the study is represented by the small cohort of patients. Studies on larger case series will be necessary to confirm the partial results obtained.

Overall, the preliminary results of this study show that the overexpression of adipokines and chemokines in particular PAI1, NAMPT, LEP and CXCL1 not only at the level of the melanomatous lesion but also in the peritumoral adipose tissue, may represent a key event in growth and especially in the local aggressiveness of the neoplasm and therefore opens the hypothesis of a direct oncogenic role of these molecules and of the subcutaneous adipose tissue in the tumorigenesis of melanoma.

INTRODUZIONE

Il melanoma è una neoplasia cutanea che origina dai melanociti, cellule deputate alla produzione di melanina, presenti nello strato basale dell'epidermide, nei bulbi piliferi e più raramente nelle mucose, nell'occhio, nell'orecchio interno, nelle meningi e nella coroide. La malattia, nella maggior parte dei casi, si configura inizialmente come intradermica per poi nelle forme invasive estendersi al derma sottostante acquistando così la capacità di metastatizzare per via linfatica e a distanza.^{1,2}

Nel 25% dei casi il melanoma deriva dalla trasformazione neoplastica di nevi melanocitici pre-esistenti, nel restante 75% da trasformazione di melanociti da cute indenne da pre-esistenti lesioni.³

Nel 15% dei casi insorge in sede extra-cutanea, con coinvolgimento delle mucose e di organi e tessuti in cui sono rappresentati i melanociti quali le leptomeningi, la coroide. Nelle ultime 5 decadi si è assistito ad un costante aumento di incidenza del melanoma pari al 5-7% annuo nella popolazione caucasica dei paesi industrializzati. Infatti dall'essere una neoplasia rara il secolo scorso, il rischio medio oggi di melanoma ha raggiunto 1:50 in numerose popolazioni occidentali.¹

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

È possibile annoverare il melanoma tra le neoplasie a più alto grado di malignità essendo infatti il tumore cutaneo che causa annualmente il più alto numero di decessi. Pur rappresentando appena il 4% dei tumori della pelle si rende responsabile dell'80% delle morti per neoplasia cutanea.⁴

Le localizzazioni secondarie più frequenti di malattia risultano essere polmone, fegato, sistema nervoso centrale, linfonodi e osso, con drastico calo della sopravvivenza a 5 anni.⁵

Nonostante l'incidenza di questa neoplasia risulti ancora elevata nelle nazioni industrializzate, negli ultimi anni si è registrata un'iniziale stabilizzazione nel numero di nuovi casi. Tuttavia il dato non appare ancora uniforme, in relazione alla differente distribuzione nelle aree geografiche e nelle diverse fasce di età.^{3,5}

Questi dati, seppur ancora incompleti, sembrano suggerire che le campagne di screening e la diagnosi precoce si stiano dimostrando una strategia efficace nella lotta alla patologia. Permangono tuttavia alcune problematiche come il riscontro ancora di un numero elevato di lesioni localmente avanzate in alcune nazioni e la difficoltà ad estendere alle fasce di età più

avanzate i benefici correlati alle campagne di screening ed alla conseguente diagnosi precoce, raggiunti invece nei soggetti più giovani.^{6,7}

L'elevata incidenza e l'intrinseca aggressività della neoplasia dunque costituiscono ancora oggi un'ardua sfida per il dermatologo e per l'oncologo, che hanno a disposizione prevalentemente la prevenzione primaria come principale arma per poter fronteggiare adeguatamente la patologia.⁵

Alla luce di tale aspetto appare fondamentale implementare la conoscenza dei meccanismi genetici che predispongono alla malattia, che ne guidano l'evoluzione biologica e soprattutto la sua aggressività e la tendenza alla metastatizzazione nonché la resistenza ai farmaci attualmente disponibili. La conoscenza di questi fattori permetterebbe ai clinici di modulare la malattia fin dai primi stadi e di ritagliare per ogni paziente un percorso terapeutico basato sulla genetica individuale.²

Per raggiungere questo traguardo, grande impegno negli ultimi anni è stato profuso al fine di approfondire le conoscenze riguardanti i fattori di rischio, la genetica ed i meccanismi patogenetici in particolare molecolari coinvolti nella patologia. Le nuove conoscenze hanno profondamente modificato l'approccio del dermatologo e dell'oncologo alla patologia melanomatosa, che ad oggi viene considerata una neoplasia eterogenea, sia fenotipicamente che geneticamente. La più completa caratterizzazione genetica e molecolare ha permesso di comprendere i differenti comportamenti biologici del melanoma dai primordi della malattia fino alla fase avanzata. Questi studi hanno inoltre consentito la messa a punto di nuove *target therapy* a bersaglio molecolare che hanno consentito di migliorare la sopravvivenza nei pazienti con melanoma metastatico, seppur ancora in maniera transitoria o ristretta a specifici sottogruppi di pazienti.³

Parallelamente, si è andato delineando di recente il concetto che il tessuto adiposo, sia viscerale che sottocutaneo, non vada semplicisticamente considerato un apparato di stoccaggio metabolico, ma un vero e proprio organo con molteplici funzioni, tra cui quella endocrina, con secrezione di molteplici adipocitochine ad effetto sia paracrino che sistemico, prodotte e rilasciate dagli adipociti stessi sia facenti parte del tessuto adiposo sottocutaneo che del tessuto adiposo viscerale, o dalle cellule infiammatorie colonizzanti il tessuto adiposo peritumorale e viscerale, che con un meccanismo di "stato cronico di infiammazione di basso grado" contribuirebbero alla secrezione di citochine con effetto promuovente la crescita della neoplasia. Esistono molteplici dati, ottenuti da colture cellulari e/o da modelli murini di melanoma, a sostegno del fatto che tali sostanze (principalmente leptina, resistina, IGF-1, IL-6, IL-8, IL-11, LIF, PAI-1, FGF-2, endocan, HGF, VEGF, RBP-4) contribuiscano ad aumentare la

proliferazione dei melanociti neoplastici e a favorire la loro capacità di andare incontro a fenomeni di crescita senza inibizione da contatto.⁸⁻¹⁰

Oggetto del presente studio è stata quindi la caratterizzazione delle citochine ed adipochine presenti nel tessuto adiposo sottocutaneo peritumorale di pazienti affetti da melanoma, la valutazione dello stato dell'attività metabolica dello stesso e dello stress ossidativo presente comparando l'espressione adipocitochinica con 2 gruppi controllo costituiti da tessuto adiposo sottocutaneo di lesioni melanocitarie benigne (nevi melanocitari) e lesioni non melanocitarie benigne (cisti epidermoidi).

I dati ottenuti sono stati posti in relazione con i principali parametri istologici e fattori prognostici della popolazione analizzata affetta da melanoma.

Una più ampia conoscenza del profilo adipocitochinico del tessuto adiposo peritumorale nel melanoma potrebbe condurre ad una più profonda comprensione della patologia melanomatosa e ad eventuali benefici terapeutici e gestionali della stessa.¹¹

IL MELANOMA

EPIDEMIOLOGIA

L'incidenza del melanoma cutaneo ha registrato un costante incremento nelle ultime cinque decadi, in particolare nei continenti quali Europa, Nord America, Australia e Nuova Zelanda.¹²

A livello mondiale, il melanoma si colloca al 17°esimo posto tra le neoplasie più frequenti in termini di incidenza e al 22°esimo posto in termini di mortalità. L'incidenza mondiale stimata per l'anno 2020, considerando entrambi i sessi, è stata di 324.635 casi, di cui 150.627 in Europa (46.4%) e 105.172 in Nord America (32.4%); 173.844 sono stati gli uomini colpiti e 150.791 le donne. Nel 2020, l'incidenza mondiale del melanoma si è attestata a 3.4%, con una differenza per sesso corrispondente a 3.8: 100.000 nell'uomo e 3.0: 100.000 nella donna. La popolazione caucasica risulta essere più colpita rispetto ad altre popolazioni e le aree a maggiore incidenza mondiale sono rappresentate da Australia e Oceania, con una incidenza che si attesta a 35.8 casi ogni 100.000 abitanti. A seguire si collocano l'Europa occidentale con una incidenza di 18.9 casi su 100.000 abitanti, l'Europa settentrionale con 17.8 casi su 100.000 abitanti ed il Nord America con 16.1 casi su 100.000 abitanti. Per quanto riguarda la mortalità nel corso del 2020 a livello mondiale si sono registrate in totale 57.043 di cui 26.360 (46.2%) in Europa e 8.412 (14.2%) in Nord America decessi per melanoma cutaneo; 32.385 sono stati i decessi per melanoma nel sesso maschile e 24.658 nel sesso femminile. Sempre nel 2020 il melanoma cutaneo ha rappresentato lo 0.56% delle morti per neoplasia a livello mondiale con percentuale identica in entrambi i sessi. In Australia ed Oceania i decessi si sono attestati a 2.7 casi ogni 100.000 abitanti; nell'Europa occidentale a 1.5 su 100.000 abitanti; 1.9 su 100.000 abitanti in Europa settentrionale; 1.1 su 100.000 abitanti in Nord America.¹³

È importante sottolineare che all'incremento stabile di incidenza registrato nelle aree economicamente sviluppate, non corrisponde in maniera eguale l'incremento della mortalità, che ha subito una lieve deflessione per l'aumento di casi diagnosticati in stadio precoce, con malattia ancora curabile.¹²

L'Asia, in particolare l'area orientale, e l'Africa, in particolare l'area settentrionale risultano i continenti a più bassa incidenza di melanoma con rispettivamente 0.33 e 0.45 casi su 100.000 abitanti annui.¹³

L'incidenza del melanoma differisce nei due sessi e si modifica a seconda dell'area geografica considerata: in tutte le nazioni europee l'incidenza appare più alta nel sesso maschile rispetto al femminile, mentre la tendenza opposta si osserva in Nord Europa.¹²

Nel continente europeo l'incidenza media complessiva del melanoma è di 9 casi/100.000 per anno, anch'essa in aumento. Tale incidenza tende ad incrementare con la latitudine con maggiore prevalenza nelle popolazioni nordiche con fototipo chiaro (12-17 casi/100000 per anno) rispetto a quelle dei paesi mediterranei (3-5 casi/100000 per anno). Inoltre l'incidenza tra le donne è maggiore rispetto a quella tra gli uomini, come riportato sopra. E' stato osservato che i paesi europei con maggior tasso d'incidenza sono quelli Settentrionali e Nord-Occidentali quali Regno Unito, Irlanda e Paesi Bassi. L'incidenza rimane stabile in Norvegia, mentre i tassi più bassi sono stati osservati in Spagna e Portogallo.¹³

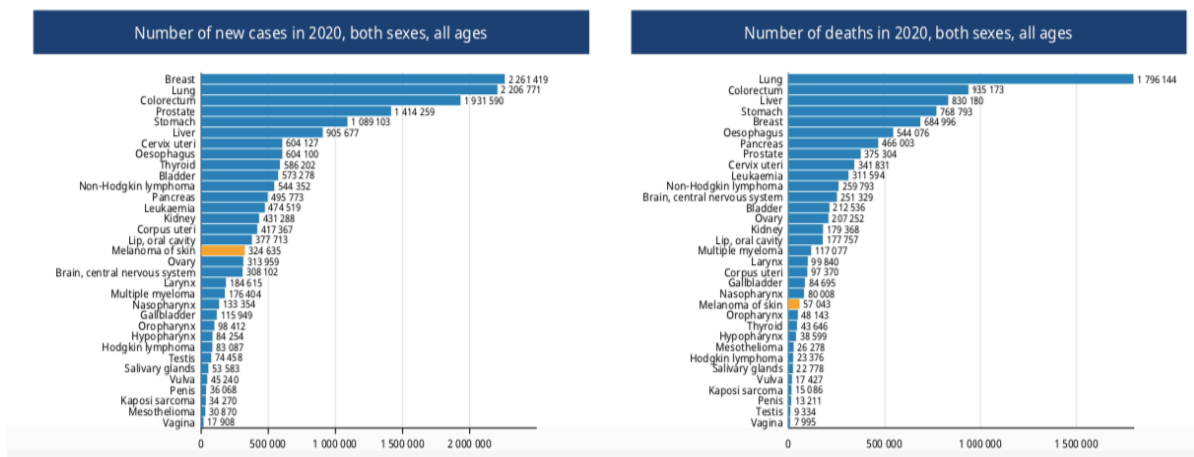


Figura 1. Incidenza del melanoma e numero di decessi mondiale anno 2020

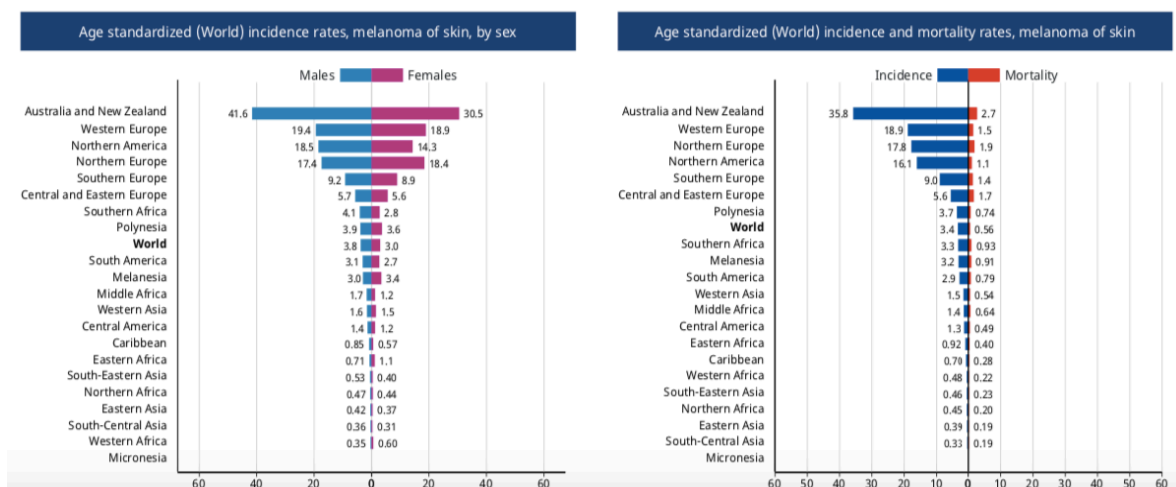


Figura 2. Incidenza del melanoma in situ vs cutaneo invasivo (A) e differenza tra incidenza e mortalità negli Stati Uniti dal 1975 al 2017

Negli Stati Uniti d'America il melanoma rappresenta il terzo tumore in termini di incidenza dopo carcinoma del seno e del polmone, con 192.000 (96.500 invasivi e 95.800 in situ) nuovi casi diagnosticati nel 2019. L'incidenza del melanoma, in passato descritto come neoplasia rara, è aumentata rapidamente e risulta essere 6 volte maggiore rispetto a quella di 40 anni fa. Di certo il rapido aumento dell'incidenza del melanoma cutaneo è determinato in gran parte da un maggiore controllo della popolazione e a screening di massa. Nonostante la loro comune cellula di origine, l'aumento delle diagnosi di melanoma registrato recentemente è limitato alle forme cutanee, mentre l'incidenza del melanoma non cutaneo è rimasta stabile nel tempo (Fig. 1). La causa di questa differenza è sconosciuta. Un'ipotesi è che la discordanza rifletta le differenze nell'accessibilità all'ispezione visiva: la pelle è prontamente accessibile all'ispezione visiva, mentre i siti non cutanei (ad esempio, oculare, orale, nasale, anale, vulvare e vaginale) non lo sono. Pertanto, l'aumento della frequenza degli esami cutanei di routine ha portato ad un maggior numero di diagnosi di melanoma cutaneo, ma non ha avuto alcun effetto sul melanoma non cutaneo.^{12,13}

In particolare si è assistito ad un incremento significativo delle diagnosi di melanoma in situ; l'incidenza del melanoma in situ risulta attualmente 50 volte superiore a quella del 1975 (25 contro 0.5 per 100.000 abitanti). Tuttavia, l'aumento del rilevamento e del trattamento del melanoma in situ non è riuscito a ridurre l'incidenza del melanoma invasivo, che è aumentata da 7.9 a 25.4 per 100.000 abitanti nello stesso periodo. La mancanza di qualsiasi effetto apprezzabile nel ridurre l'insorgenza del melanoma invasivo suggerisce che il melanoma in situ non è un precursore regolare - tanto meno un precursore obbligato - del melanoma invasivo.¹²

Infatti mentre l'incidenza del melanoma è aumentata vertiginosamente, la mortalità dello stesso è rimasta generalmente stabile, con una lieve riduzione registrata negli ultimi anni attribuibile più che alla diagnosi precoce, ai progressi terapeutici mediante l'introduzione dell'immunoterapia (inibitori del checkpoint) e delle terapie a bersaglio molecolare per il melanoma metastatico. Tuttavia appare interessante il dato riportato in Australia (dove si registrano i valori di incidenza di melanoma più alti nella popolazione caucasica), dove l'attuazione sistematica e continua di programmi di prevenzione primaria, che si sono concentrati sulla protezione solare dei bambini e sulla introduzione stabile di politiche nei centri per l'infanzia e nelle scuole per rafforzare i comportamenti di protezione ai raggi ultravioletti durante l'attività all'aperto nel corso degli ultimi decenni, ha fatto registrare - per la prima volta a livello mondiale - un significativo declino del melanoma sottile invasivo in soggetti di età compresa tra i 15 e i 24 anni.^{12,13}

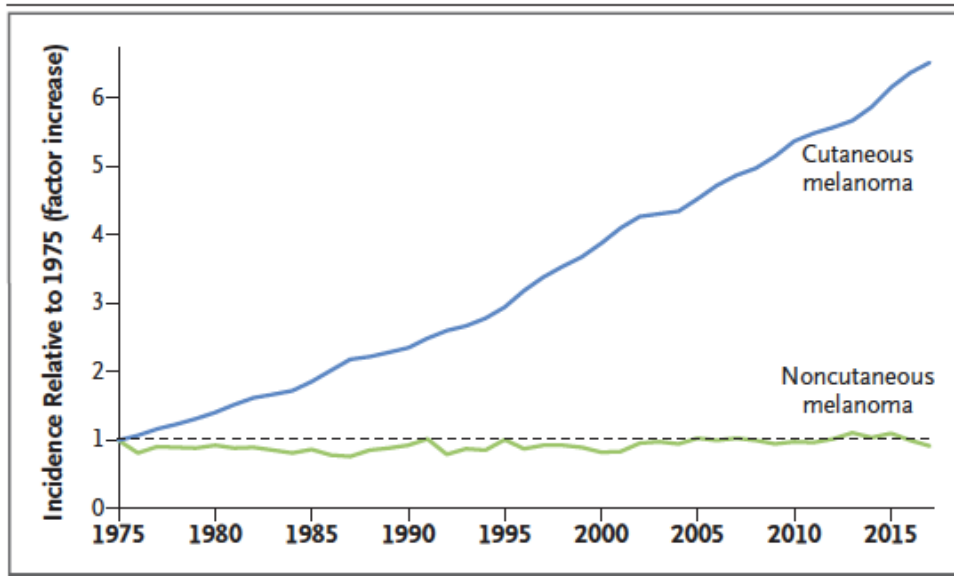


Figura 3. Incidenza del melanoma cutaneo e del melanoma non cutaneo negli Stati Uniti dal 1975 al 2017

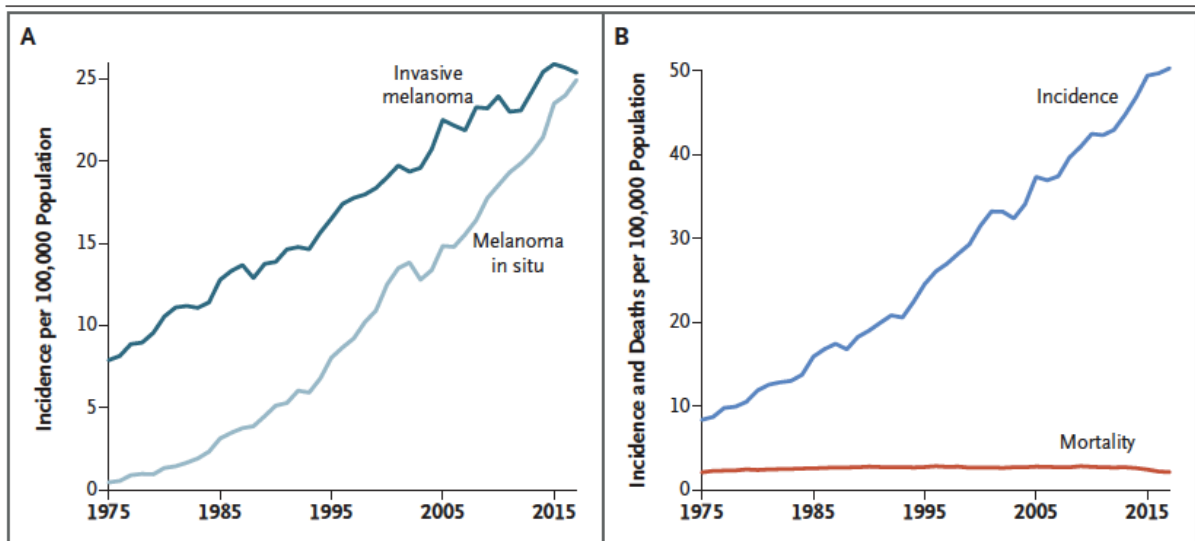


Figura 4. Incidenza del melanoma in situ vs cutaneo invasivo (A) e differenza tra incidenza e mortalità negli Stati Uniti dal 1975 al 2017

In Italia il melanoma ha rappresentato il 4.2% della totalità delle patologie tumorali manifestatesi nel corso dell'anno 2019, anno in cui si sono registrati complessivamente 14.863 nuovi casi di melanoma, di cui 8.147 (4%) nel sesso maschile e 6.716 (3.7%) nel sesso femminile. La situazione epidemiologica italiana è pertanto in linea con quella dei paesi più sviluppati, con un tasso medio di incidenza è di 20.4 ogni 100.000 abitanti nei maschi e di 16.5 nelle femmine. In Italia la patologia melanomatosa si colloca all'ottavo posto per incidenza. Nella fascia di età 0-

49 rappresenta il secondo tumore in termini di incidenza (preceduto dal tumore testicolare) nella popolazione maschile e terzo tumore in ordine di frequenza (preceduto dal carcinoma mammario e della tiroide) in quella femminile. L'aumento dell'incidenza evidenziato sembra essere in parte legato al sempre crescente impegno dei clinici nella diagnosi precoce grazie ad una maggiore diffusione degli strumenti diagnostici e delle campagne di screening ed in parte all'aumento delle conoscenze eziopatogenetiche che permettono adeguata prevenzione. Dai dati si evince che in Italia, similmente a quanto registrato in Europa, viene rilevato un gradiente geografico Nord-Sud, con valori massimi di incidenza nelle regioni del centro-nord e minimi al sud e nelle isole con tassi di incidenza fino a due volte più bassi in Italia meridionale e insulare rispetto a quelli nelle aree del centro-nord Italia. Secondo i dati Istat nel corso del 2017 in Italia si sono verificate 2.065 morti per melanoma cutaneo 1.193 nel sesso maschile e 872 nel sesso femminile; con una mortalità sostanzialmente invariata nei due sessi nell'ultimo decennio. In Italia, la sopravvivenza netta a 5 anni standardizzata per età è dell'85% per gli uomini e dell'89% per le donne (pool di 42 Registri Tumori: 22.023 casi osservati) [AIRTUM: www.registri-tumori.it]. Considerando le diverse aree geografiche, si registrano differenze di sopravvivenza netta a 5 anni: dall'88% in uomini e 91% in donne nel Nord Est, all'85% in uomini e 89% in donne nel Nord Ovest e Centro Italia, fino all'80% in uomini e 84% in donne nel Sud Italia. Nel 2019, sono circa 160.000 i cittadini italiani (0.3% del totale) con pregressa diagnosi di melanoma (in Italia, i casi prevalenti erano circa 80.000 nel 2006) (4). In termini di prevalenza si contano attualmente 169.900 persone viventi in Italia dopo una diagnosi di melanoma della cute, rispettivamente 80.100 maschi e 89.800 femmine.¹⁴

Riassumendo i dati si desume come in Italia e nelle altre nazioni economicamente più sviluppate, per quanto riguarda l'incidenza del melanoma, sia riscontrabile uno incremento stabile e come risultino maggiormente colpiti gli adulti tra i 30 e i 60 anni di età. Sempre per quanto riguarda l'incidenza risulta presente una lieve predilezione della malattia per il sesso maschile. Inoltre, a dispetto dell'incremento numerico dei casi, la mortalità risulta stabile o in declino per la maggior parte dei paesi economicamente avanzati.¹²

In Italia i melanomi rappresentano indubbiamente i tumori che hanno registrato il maggior incremento medio annuale, negli uomini (+8,8% in totale, +9,1% negli over 70) come nelle donne (+7,1% in totale, +7,6% nelle under 50) e in tutte le fasce di età. Si tratta di incrementi molto sostenuti che, sebbene rispecchino esposizioni iniziate nei decenni scorsi (in particolare esposizioni volontarie ai raggi UV) e la recente disponibilità di tecniche diagnostiche sempre più accurate, indicano la necessità di implementare interventi tempestivi di prevenzione primaria per invertire tale andamento nei prossimi anni. Alcune fonti individuano però una diversa tendenza

nei dati per la fascia di età più anziana della popolazione; infatti anche in aree geografiche ove le campagne di screening e la diagnosi precoce sembrano funzionare efficacemente, per le altre fasce di età, si assiste ancora ad un incremento sia dell'incidenza che della mortalità. Esempio significativo è rappresentato dall'incremento del 3-4% annuo di quest'ultima tra gli over 80 italiani.¹⁴

In occasione delle campagne di screening nazionali è stato rilevato come solo il 25% dei pazienti esaminati appartenga alla popolazione anziana. Il campione sembra dunque inadeguato, per garantire l'efficacia della campagna, visto che oltre il 44% delle nuove lesioni melanomatose insorgono in questa fascia di età e che è stato inoltre dimostrato come sia presente un incremento dello spessore di Breslow, del livello di invasione di Clark e del riscontro di ulcerazione con l'aumentare dell'età.¹⁵

Da questi ultimi dati sembra importante quindi procedere con una campagna di prevenzione mirata a tale fascia di popolazione, alla quale cercare di estendere i benefici ottenibili della diagnosi in stadio precoce.⁶

FATTORI DI RISCHIO

L'eziologia del melanoma è ancora oggi oggetto di dibattito e discussione. Trattasi di una patologia ad eziogenesi multifattoriale al cui sviluppo concorrono una combinazione di fattori di rischio costituzionali (genetici) ed ambientali. Parte dell'incremento d'incidenza del melanoma cutaneo, sembra attribuibile ad un effettivo aumento del ruolo causale di alcuni fattori ambientali, come ad esempio l'esposizione alla radiazione UV, mentre la frazione di malattia attribuibile in misura preponderante a fattori genetici-fenotipici sembra rimanere stabile nel tempo. Tale frazione concorre circa al 10-15% dei melanomi cutanei secondo le attuali conoscenze.¹⁴

I fattori di rischio costituzionali comprendono: ⁶

- Fototipo I e II di Fitzpatrick,¹
- Etnia caucasica,⁶
- Presenza di nevi congeniti giganti,¹⁶
- Presenza di un elevato numero di nevi melanocitici,⁶
- Presenza di numerosi nevi atipici,¹⁷
- Presenza di anamnesi familiare positiva per melanoma,¹
- Presenza di anamnesi personale positiva per pregresso melanoma cutaneo,^{1,6}

- Presenza di storia personale ed anamnesi familiare positiva per malattia di Parkinson,¹⁸
- Stati di immunodepressione.^{1,2,6}

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

- Esposizione alle radiazioni ultraviolette (solari e lampade UV artificiali),^{1,2}
- Fattori dietetici,¹⁹
- Elevato BMI (sovrappeso–obesità),²⁰
- Stile di vita e livelli sierici di leptina,²¹
- Fattori occupazionali (fotoesposizione, PCB – policlorobifenili, uso di composti chimici in agricoltura, piloti e personale di bordo di aerei di linea,) ^{22,23}
- Utilizzo di farmaci immunosoppressivi,²⁴
- Utilizzo altri farmaci: sildenafil.²⁵

Caratteristiche fenotipiche

Numerosi studi epidemiologici sono presenti in letteratura volti ad analizzare la correlazione sussistente tra caratteristiche fenotipiche del soggetto ed il rischio di insorgenza di melanoma cutaneo.²⁶ Tali risultati hanno dimostrato come i pazienti con fototipo chiaro Fitzpatrick I rispetto a quelli con fototipo Fitzpatrick IV mostrano un rischio relativo di melanoma di 2.0.²⁷ Olsen et al, in una revisione sistematica della letteratura e metanalisi di 66 lavori internazionali pubblicati nel periodo tra il 1979 e il 2008, ha valutato il rischio relativo dei pazienti in riferimento alle caratteristiche fenotipiche dei pazienti osservando che tale rischio si attesta a 2.64 per soggetti con capelli rossi/rosso-biondi, 2.0 per quelli biondi e 1.46 per quelli castano chiaro rispetto a soggetti con capelli scuri; 1.57 per i soggetti con iride blu/blu-grigio, 1.51 per quelli verdi/grigi/nocciola rispetto a quelli con occhi neri; 2.27, 1.99 e 1.35 per i soggetti con fototipo I, II e III rispettivamente rispetto al fototipo IV; 1.99 per i soggetti con efelidi rispetto a quelli senza. Inoltre gli Autori hanno calcolato che il valore di Population Attributable Fraction (PAF) ovvero la quantificazione nella popolazione del contributo alla malattia di un singolo fattore di rischio, espressa come la riduzione percentuale della malattia che si osserverebbe nella popolazione in esame se quel fattore di rischio non esistesse, (*WHO, health statistics and information systems*) si attesta al 27% per il fototipo I/II, al 23% per la presenza di efelidi, al 23% per il colore chiaro/biondo dei capelli, al 18% per gli occhi blu/blu-grigi e al 13% per gli occhi verdi/grigi/nocciola.²⁸

I dati di letteratura pongono pertanto in luce che i soggetti con cute, occhi e capelli chiari e con fototipo I/II presentino un rischio di melanoma doppio rispetto ai soggetti con pelle scura/olivastra e con occhi, capelli scuri/neri e fototipo IV.^{26,28}

Sebbene lo *screening* di massa rappresenti il migliore presidio di prevenzione, esso non è sempre attuabile per via degli alti costi riferibili alla necessità, da parte di specialisti dermatologi, di esaminare tutti i soggetti di età superiore ai 16-18 anni. Risulta pertanto maggiormente applicabile uno *screening* mirato ai soggetti ad alto rischio (es: soggetti con familiarità per melanoma, caratteristiche fenotipiche).²⁶

Numero di nevi e numero di nevi atipici

Numerosi studi svolti in differenti aree geografiche come Nord America, Europa e Australia hanno confermato come un elevato numero di nevi melanocitici rappresenti un fattore di rischio importante per lo sviluppo del melanoma cutaneo. Circa un 25% dei melanomi cutanei insorge su nevi melanocitici pre-esistenti. La presenza di un numero elevato di nevi melanocitici depone anche a favore di una elevata fotoesposizione del soggetto, in quanto un elevato numero di nevi spesso risulta associato ad una storia personale di frequente e duratura esposizione ai raggi UV.¹²

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative, per numero dei nevi nei due sessi, eccetto che per i nevi melanocitici del tronco, che risultano essere più numerosi nel sesso maschile.²⁹

La presenza di un numero elevato di nevi melanocitici sembra risultare il fattore di rischio fenotipico di maggior rilievo: una recente meta-analisi afferma che una conta di nevi melanocitici compresa tra 101 e 120, comporti un rischio relativo di 6.89 per lo sviluppo melanoma cutaneo rispetto ad una conta il cui numero risulti inferiore a 15.⁶

Dati presenti in letteratura rilevano che il 42% dei melanomi cutanei insorge in pazienti con un numero di nevi pari o superiore a 25; questo sembra essere il limite oltre il quale il rischio relativo si innalza sensibilmente.³⁰

Studi effettuati sui gemelli omozigoti hanno dimostrato che il numero di nevi è prevalentemente geneticamente determinato, ma possono intercorrere influenze ambientali.⁶

È stato inoltre recentemente documentato come l'espressione di polimorfismi di alcuni geni (es: MTAP e PLA2G6) si associ ad un numero maggiore di nevi melanocitici e ad un aumentato rischio di insorgenza di melanoma cutaneo.³¹

Per quanto riguarda i nevi atipici, pazienti con un singolo nevo atipico presentano un rischio relativo di 3.63 di sviluppare un melanoma cutaneo.^{26,30}

La metanalisi condotta da Gandini et al del 2005 ha riportato nei soggetti con 5 o più nevi atipici un rischio relativo di sviluppare melanoma di 6.36 rispetto a chi non presenta nevi atipici.²⁶

Tale rischio aumenta ulteriormente in caso di compresenza di nevi atipici e di anamnesi familiare positiva per melanoma.³⁰

La “sindrome del nevo displastico” (AMS: Atypical Mole Syndrome), caratterizzata dalla presenza di numerosi nevi displastici, comporta un rischio da 6 a 22 volte maggiore di sviluppare un melanoma rispetto agli individui non affetti.⁴¹ La diagnosi di AMS è solitamente clinica ed in un numero elevato di casi associata alla mutazione germinale del gene CDKN2A. Inoltre i melanomi riscontrati in individui con diagnosi di AMS risultano insorgere precocemente rispetto alla popolazione generale ed in sedi meno comuni come cuoio capelluto, occhio ed anche in sedi extracutanee. È stato dimostrato anche un aumentato rischio di presentare melanomi multipli nel corso della vita.^{3,6}

Nevi giganti congeniti

Nei pazienti con nevi congeniti giganti, aventi cioè un diametro maggiore o uguale a 20 cm, il rischio di sviluppare melanoma varia dal 5 al 10% ed il rischio relativo di sviluppare melanoma risulta 2.000 volte maggiore rispetto alla popolazione generale.^{16,17}

Il rischio è determinato anche dal fatto che questi pazienti presentano voluminosi aggregati di melanociti in sedi profonde ed extracutanee, che possono andare incontro più facilmente a modificazione neoplastica. Le sedi più comunemente coinvolte sono il sistema nervoso centrale, il retro-peritoneo e la mucosa del tratto gastrointestinale.¹⁷

È importante ricordare che i melanomi insorti in soggetti con nevi congeniti giganti tendono ad avere un esordio molto precoce, in molti casi anche prima della pubertà. In questi pazienti la prognosi risulta peggiore, perchè la trasformazione neoplastica può spesso iniziare direttamente da cellule poste nel derma profondo e questo comporta una precoce invasione di vasi linfatici ed ematici, con conseguente metastatizzazione linfonodale o sistemica. Ulteriore problematica delle lesioni giganti è che spesso si collocano sulla linea mediana del corpo o la oltrepassano con la possibilità di coinvolgere multiple stazioni linfatiche di drenaggio.¹⁶

Familiarità per melanoma

Il 10% dei pazienti affetti da melanoma riferisce in anamnesi un familiare di primo grado affetto dalla medesima patologia ed il 5% di tutti i melanomi cutanei insorge in pazienti con 2 o più familiari di primo grado affetti da tale patologia.^{17,12}

Attualmente si stima però che solamente 1-2% dei melanomi siano attribuibili ad un difetto genetico ereditato identificabile.^{17,32}

I recenti progressi di biologia molecolare hanno consentito un avanzamento nella possibilità di stimare quale sia il livello di rischio genetico del singolo individuo o in gruppi. Si ritiene che alleli ad alto rischio per lo sviluppo di melanoma siano espressi in gruppi familiari ristretti, dove si riscontrano numerosi melanomi, mentre alleli che conferiscono un rischio più basso (es: polimorfismi genetici) possono più spesso essere riscontrati in casi sporadici.⁶

Altri autori, data la sempre maggiore mole di dati disponibile nel campo della genetica del melanoma, preferiscono dividere le mutazioni genetiche in ad alta, intermedia o bassa penetranza. Queste ultime risultano possedere una prevalenza molto alta nella popolazione generale ma conferiscono un basso rischio per la patogenesi del melanoma, se prese singolarmente.³³

La mutazione ad alto rischio maggiormente studiata e caratterizzata è quella coinvolgente il gene oncosoppressore *CDKN2A*, localizzato a livello del cromosoma 9p21, che codifica per 2 proteine deputate al controllo negativo del ciclo cellulare: p16ink4a e p14ARF. La mutazione germinale di questo gene è stata riscontrata nel 20-30% delle famiglie sospettate di avere una mutazione genetica predisponente il melanoma ereditario.³⁴

Altra mutazione ad alto rischio, meno frequente rispetto alla precedente, concerne il proto-oncogene *CDK4*, codificato a livello di 12q14. Tale mutazione germinale altera il sito di aggancio della proteina che interagisce con p16, con conseguente simile deregolazione del ciclo cellulare.^{1,34}

Si stima che nelle famiglie con 3 o più soggetti affetti da melanoma, una percentuale variabile di soggetti, compresa tra il 20% ed il 40%, risulta positiva per mutazione germinale a carico di *CDKN2A*, mentre una percentuale <5% è portatrice di mutazione a carico del gene *CDK4*.²⁶

Tale mutazione sembra conferire un rischio genetico di sviluppare melanoma compreso tra il 20% e il 57%, per cui si ritiene probabile che possano esistere altri alleli ad alto rischio, ancora da caratterizzare.³⁴

Le mutazioni di *CDKN2A*, comportano forme mutanti di p16ink4a che non sono più in grado di inibire le kinasi ciclina dipendenti *CDK4* e *CDK6*; conseguentemente la proteina del

retinoblastoma (RB) passa allo stato iperfosforilato, consentendo la transizione dalla fase G1 alla S del ciclo cellulare e la conseguente proliferazione.^{24,34}

La perdita della funzione di p14ARF si traduce invece in una perdita di funzione di p53, il principale oncosoppressore deputato al blocco del ciclo cellulare. Le due mutazioni presentano eredità autosomica dominante a penetranza incompleta.³⁵

La penetranza della mutazione di CDKN2A, come evidenziato da uno studio condotto dal International Melanoma Genetics Consortium, si attesta al 30% sino al compimento del cinquantesimo anno di età e al 67% fino al compimento dell'ottantesimo anno di 80 età. Queste percentuali presentano una certa variabilità in base alla regione geografica, il che testimonierebbe la possibile interferenza di fattori ambientali, e/o di altri geni modificatori coereditati.^{34,1}

È stato parallelamente osservato in altri studi che polimorfismi del gene per il recettore 1 della melanocortina (MC1R) e caratteristiche fenotipiche a rischio, possono aumentare la penetranza della mutazione aumentando il rischio di sviluppare malattia nei soggetti portatori. Il rischio sembra ancora più elevato per individui che ereditano in blocco più polimorfismi genetici ad alto rischio del recettore MC1R come ad esempio: V60L, V92M, R151C e R160W.³⁶

Negli ultimi anni sono state scoperte nuove mutazioni germinali, come quelle coinvolgenti i geni BAP1 e TERT, considerate ad alta penetranza ed ancora oggetto di studi per una più completa caratterizzazione epidemiologica.³³

Queste mutazioni sono state dimostrate responsabili dello sviluppo di casi di melanoma familiare, e per quanto riguarda BAP1, anche di sindromi più complesse, che comprendono lo sviluppo di melanoma cutaneo e molto spesso anche uveale, proliferazioni melanocitiche cutanee atipiche (dette "BAP-omi"), ed altre neoplasie maligne in vari organi, tra cui mesoteliomi e carcinomi renali, che delineano la sindrome "COMMON" (Cutaneous-Ocular Melanoma, Melanocytic proliferations and Other internal Neoplasms).³⁷

La mutazione germinale di TERT, gene codificante per la subunità catalitica della telomerasi, è ad oggi ritenuta molto rara ma ad alta penetranza.³⁸

Tale mutazione risulta al contrario molto frequente, come mutazione acquisita (somatica), nei melanomi sporadici dove insorge molto probabilmente a seguito del danno da esposizione ai raggi UV ed è infatti riscontrabile anche a livello di altre neoplasie cutanee come il carcinoma basocellulare e spinocellulare. In uno studio recente di Griewank la presenza della mutazione somatica di TERT in melanomi sporadici non localizzati alle estremità, risulta essere anche un fattore prognostico indipendente per quanto riguarda la sopravvivenza.^{39,40}

Mutazioni a penetranza incompleta che risultano in un maggiore rischio di melanoma sono quelle a carico dei geni MC1R e MITF (variante E318K).³³

Il gene MC1R presenta molti polimorfismi in numerose regioni, che sono responsabili di alcune caratteristiche fenotipiche comprese nel fototipo I di Fitzpatrick; infatti l'80% degli individui con queste caratteristiche presenta polimorfismi del gene MC1R. Tale fenotipo, come già accenato precedentemente, rappresenta un rischio per lo sviluppo del melanoma cutaneo, conferendo maggiore suscettibilità a fattori ambientali come l'esposizione UV.⁴¹

D'altro canto alcuni studi, incentrati in particolare su nove polimorfismi del gene MC1R, riscontrano un rischio aumentato in questi individui che risulta in parte indipendente dalle caratteristiche fenotipiche, o dai fattori ambientali, suggerendo che a queste varianti genetiche possano fare capo molteplici meccanismi di cancerogenesi. Ulteriori studi hanno portato alla scoperta che il polimorfismo E318K del gene MITF, codificante per un fattore di trascrizione che regola lo sviluppo dei melanociti, è presente in famiglie con multipli casi di melanoma, negative per mutazioni a penetranza maggiore (CDKN2A e CDK4), in una percentuale che varia dallo 0,8% al 7,4%. Il rischio dei portatori di tale polimorfismo di sviluppare un melanoma risulta 2,33 volte superiore rispetto alla popolazione generale ed è stata inoltre riportata anche una maggior tendenza allo sviluppo di melanomi multipli.³³

Risultati analoghi sono stati ottenuti per polimorfismi E318K del gene MC1R; tale variante risulta statisticamente associata ad un basso numero di nevi melanocitici ed all'assenza del colore blu dell'iride, e attribuisce con un rischio più alto ai pazienti con capelli di colore scuro o nero.^{3,43}

Il rischio conferito appare dunque totalmente indipendente dalle classiche caratteristiche fenotipiche ed è probabile che nella cancerogenesi sia implicata una diversa attività del prodotto di trascrizione del gene.⁴²

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

Gli alleli a bassa penetranza, per la predisposizione ereditaria al melanoma, comprendono 51 geni che regolano alcune caratteristiche importanti come la pigmentazione cutanea come la numerosità dei nevi melanocitici, la risposta immunitaria nei confronti di una eventuale neoplasia, la riparazione del DNA, il metabolismo di detossificazione di alcune sostanze e la funzione del recettore della vitamina D.³³

Si tratta in maggioranza di geni che sono interessati frequentemente da polimorfismi genetici ereditabili, per lo più polimorfismi a singolo nucleotide (SNP), che manifestano bassa penetranza per melanoma nei soggetti interessati, ma sono presenti con alta prevalenza all'interno della

popolazione. La neoplasia in questi casi si manifesta in età più avanzata rispetto ai soggetti interessati dalle mutazioni CDKN2A e CDK4. Questi polimorfismi genetici comportano inoltre un rischio minore se considerati singolarmente rispetto alle mutazioni ad alta penetranza e subiscono un'influenza maggiore da parte dei fattori di rischio ambientali.^{33,44}

Sono stati indagati anche i polimorfismi del recettore della vitamina D, che presenta ben 196 polimorfismi a singolo nucleotide, è stato dimostrato che alcuni di essi (es: polimorfismo *FokI*) incrementano il rischio di melanoma cutaneo mentre altri (es: polimorfismo *BsmI*) lo ridurrebbero. Il polimorfismo *FokI* inoltre, se presente in omozigosi, sembrerebbe incrementare il rischio di insorgenza di melanomi cutanei del 21%, rispetto agli individui “*wild-type*”.⁴⁵

Uno studio più recente ha confermato questi risultati, descrivendo un rischio aumentato di melanoma anche nei pazienti con polimorfismo *TaqI*, sia in eterozigosi ed ancora più in omozigosi.⁴⁶

Diagnosi di pregresso melanoma

È noto da tempo che i pazienti che presentano una positività anamnestica per melanoma cutaneo, possiedono un maggior rischio di sviluppare un secondo melanoma cutaneo primitivo nel corso della vita.⁴⁷

Un recente studio ha dimostrato che un rischio maggiore è evidenziabile nei pazienti affetti dalla prima lesione ad un'età inferiore a 40 anni e che questa presentazione anticipata viene spesso condizionata da fattori genetici. Il rischio relativo di presentare un secondo melanoma nel corso della vita in questi pazienti è stimato a 15.1.⁴⁸

Altri autori stimano un aumento del rischio di circa 9 volte rispetto alla popolazione generale.³

Anche una diagnosi pregressa di *non-melanoma skin cancer (NMSC)* si associa ad un aumentato rischio di melanoma di 3.6 volte. È stata altrettanto dimostrata l'associazione inversa ovvero una diagnosi di melanoma incrementa il rischio di sviluppare successivamente NMSC. L'incremento del rischio d'insorgenza di un secondo melanoma sembra permanere ben oltre 10 anni dalla diagnosi del primo tumore, ed è per questo che i pazienti necessitano di un attento e protratto follow-up.^{47,48}

Studi preliminari indicano inoltre che una diagnosi di melanoma, carcinoma basocellulare o squamocellulare, incrementa il rischio di una successiva diagnosi di neoplasia non di pertinenza cutanea quali neoplasie del distretto testa collo e carcinoma pancreatico.⁴⁸

Malattia di Parkinson e melanoma

L'associazione tra melanoma e malattia di Parkinson è ancora in fase di definizione. Studi presenti in letteratura sembrano dimostrare la significatività di tale relazione, riportando nei pazienti affetti da Parkinson un maggior rischio di insorgenza di melanoma rispetto alla popolazione generale.¹⁸

Il rischio relativo di insorgenza di melanoma nei pazienti affetti da malattia di Parkinson risulta infatti essere secondo stime recenti 7 volte superiore rispetto alla popolazione generale e sembra non correlare con il sesso, la durata della patologia neurologica e l'assunzione di levodopa utilizzata nel trattamento di tali pazienti.^{49,50}

I meccanismi patogenetici alla base di tale associazione non sono stati completamente delineati. Sono state tuttavia avanzate diverse ipotesi, che includono fattori ambientali /stile di vita condivisi (esempio fumo e stato socioeconomico) e mutazioni genetiche comuni che coinvolgono in particolare i seguenti geni PRKN, LRRK2, PARK7 e SNCA.⁵¹

I dati più recenti presenti in letteratura si concentrano proprio su SNCA, gene che codifica per la proteina alfa-sinucleina (α -Syn), che è rappresentata nel sistema nervoso centrale. Svolge un ruolo nel controllo della mobilità delle vescicole sinaptiche, regolando il rilascio di neurotrasmettitori come la dopamina. α -Syn può interagire con la tirosinasi (TYR) e la tirosina idrossilasi, che sono enzimi coinvolti rispettivamente nella biosintesi di melanina e dopamina. Le mutazioni in SNCA causano demenza con corpi di Lewy e malattia di Parkinson. Elevati livelli di espressione di α -Syn sono stati indicati nelle cellule della pelle di pazienti con malattia di Parkinson e nei tessuti metastatici di pazienti con melanoma. Uno studio su cellule di melanoma ha mostrato che α -Syn potrebbe avere effetti inibitori sulla sintesi della melanina nelle cellule di melanoma. Alcuni ricercatori hanno proposto che la neuromelanina potrebbe avere un'interazione diretta con α -Syn. Tuttavia, non è certo se α -Syn abbia un ruolo diretto nella sintesi della melanina cutanea o nel melanom.^{50,51,52}

A sostegno del fatto che melanoma e il morbo di Parkinson possano condividere alterazioni genetiche comuni anche il fatto come riportato da un ampio studio prospettico condotto da Gao *et al* che un'anamnesi familiare positiva tra parenti di primo grado per melanoma sembrerebbe predisporre all'insorgenza di Parkinson con un rischio relativo di 1.85.⁵¹

Fattori ambientali

L'esposizione alle radiazioni ultraviolette (UV) è ormai da tempo riconosciuto come il principale fattore di rischio ambientale nell'insorgenza del melanoma cutaneo, sia in rapporto alle dosi assorbite, sia in rapporto al tipo di esposizione (cronica e/o intermittente).⁵³

La fotoesposizione rappresenta un fattore di rischio in tutte le fasce d'età, ma l'esposizione in epoca pediatrica ed adolescenziale si associa ad un rischio maggiore.^{17,53}

I fattori costituzionali quali fototipo e la tendenza a sviluppare nevi dopo la fotoesposizione interagiscono sinergicamente con il fattore di rischio ambientale dato dalla fotoesposizione. Infatti nelle popolazioni a fototipo chiaro (I-II) l'incidenza del melanoma cutaneo varia a seconda della latitudine di residenza, con drastico aumento del numero dei casi riscontrati in presenza di climi soleggiati. Per quanto riguarda la lunghezza d'onda, sono determinanti nel danno fotoindotto sia la radiazione UVA (320-400nm) sia quella UVB (280-320nm). I raggi UVA costituiscono la maggior componente ultravioletta che arriva sulla terra (il 90-95% della radiazione UV totale), penetrano nella cute fino al derma e agiscono promuovendo la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che sono in grado di ossidare molteplici componenti cellulari come carboidrati, lipidi, proteine e DNA. L'interazione tra i ROS e la doppia elica può portare a fenomeni di rottura del singolo filamento (SSB), crosslink tra DNA e proteine e soprattutto ossidazione delle basi. La base più suscettibile all'ossidazione è la guanina che diventa 8-oxo-7,8-diidroguanina, importante promotore di fenomeni di cancerogenesi.^{6,53}

L'irradiazione UVB raggiunge solo per il 5% la superficie terrestre e nonostante sia in grado di penetrare solo fino allo strato epidermico della cute risulta comunque estremamente dannosa a causa dell'alta energia che possiede. Gli UVB, infatti, sono direttamente assorbiti dal DNA e generano la produzione di fotoprodotti (6-4 pirimidina-pirimidone fotoprodotti, 6-4 PP) e soprattutto dimeri di pirimidine (CPDs) che possono portare a fenomeni apoptotici o di cancerogenesi. Anche gli aminoacidi aromatici come il triptofano e la tirosina sono potenti cromofori dei raggi UVB e le loro modificazioni possono alterare la struttura e quindi la funzione delle proteine. Oltre a questo, gli UVB sono in grado di produrre anche specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS).⁵³

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

studi affermano infatti che 5 episodi di ustione solare comportino un rischio doppio di sviluppare un melanoma.³

La fotoesposizione di tipo “acuto e intermittente” rispetto a quella “cronica e continua” sembra essere quella che predispone maggiormente allo sviluppo del melanoma cutaneo. Numerosi studi hanno dimostrato come persone con fototipo chiaro, che lavorano solitamente in ambienti chiusi ma che si recano in villeggiatura in località molto soleggiate, o che si espongono alla luce solare in maniera intensa ed intermittente, risultino particolarmente a rischio.^{26,54}

È stata recentemente indagata la possibile correlazione tra la modalità di esposizione solare in relazione alla sede anatomica colpita. Da questi studi è emerso che il ruolo dell'esposizione solare nella genesi del melanoma, cambia a seconda della zona esposta: un'esposizione cronica sembra correlare con l'insorgenza di melanomi della testa e del collo, mentre l'esposizione solare intermittente costituisce invece un fattore di rischio per lo sviluppo dei melanomi del tronco.⁵³

L'uso di lampade UV artificiali e lettini solari è da tempo considerato un fattore favorente lo sviluppo di malattia con un incremento del rischio relativo di sviluppare un melanoma cutaneo di 2.58.^{69,70} Studi più recenti confermano tali risultati e mostrano un aumento del rischio direttamente proporzionale al numero di esposizioni con apparecchiature UV *indoor*, anche considerando lettini solari e lampade abbronzanti di ultima generazione.⁵⁴

Una recente meta-analisi di 57 studi incentrati sull'associazione tra tipologia di esposizione solare e melanoma ha dimostrato che l'esposizione al sole si associa di per sé ad un rischio relativo di 1.34, l'esposizione cronica al sole di 0.95 e l'esposizione intermittente al sole di 1.61. Una anamnesi positiva per pregresse ustioni solari, si associa a rischio relativo di 2.03. Per quanto concerne l'uso di lampade artificiali, una recente meta-analisi coinvolgente 27 studi finalizzata a valutare il ruolo del lettino abbronzante nella genesi del melanoma ha dimostrato che il suo uso si associa ad un rischio relativo sommario di 1.20. L'uso frequente (rispetto a nessun uso) di un lettino comporta un rischio relativo di 1.42 e l'utilizzo delle lampade artificiali a un'età inferiore ai 35 anni (rispetto a ≥ 35 anni di età) si associa ad un rischio relativo di 1.59. Recentemente l'International Agency for Research on Cancer (IARC) e l'Organizzazione mondiale della Sanità (OMS) ha incluso l'uso di lampade e/o lettini che impiegano UV artificiali fattori cancerogeni per l'uomo in quanto favorenti l'insorgenza di melanoma cutaneo.^{17,55}

Fattori dietetici

Mackie et al., mediante l'esecuzione di numerosi studi caso-controllo condotti tra il 1974 e il 1987 in Australia, hanno identificato nella dieta un possibile fattore di rischio per lo sviluppo del melanoma cutaneo. Veniva infatti riscontrato un aumento del contenuto medio di acidi grassi polinsaturi, soprattutto acido linoleico ed arachidonico, nei trigliceridi del tessuto adiposo sottocutaneo dei pazienti affetti. Studi dell'epoca avevano dimostrato come in un periodo di incremento nell'incidenza del melanoma cutaneo fosse stato preceduto e poi accompagnato da un forte incremento nella dieta di acidi grassi polinsaturi (soprattutto linoleico ed arachidonico), contenuti in margarine, oli vegetali, cibi precotti ed altri alimenti in uso in tale periodo. Parimenti era stato anche dimostrato come un alto contenuto di acido linoleico nella dieta, comporti una veloce incorporazione di questo nelle membrane cellulari e un rapido incremento della sintesi di prostaglandine in tutto l'organismo: queste molecole risultano coinvolte nella progressione del melanoma e di altri tumori maligni. In base a tali evidenze gli autori concludevano considerarono l'eccessivo consumo di acidi grassi polinsaturi un potenziale fattore di rischio per lo sviluppo della patologia melanomatosa.¹⁹

Recenti studi hanno tentato di spiegare tale correlazione dimostrando che la prostaglandina-E2, capace di incrementare la capacità invasiva delle cellule del melanoma, viene sintetizzata in quantità maggiori durante l'esposizione ad alte concentrazioni di acidi grassi tissutali ω -6.⁵⁶

Ad oggi però non sono stati ripetuti studi che indaghino il rischio d'insorgenza di melanoma in funzione della composizione degli acidi grassi del tessuto adiposo sottocutaneo prelevato tramite biopsia. Il lavoro di Mackie *et al* seppure datato, rappresenta ad oggi l'unico tentativo in tale direzione.⁵⁷

Altri lavori hanno indagato invece la correlazione tra la presenza e composizione degli acidi grassi nel siero e il rischio d'insorgenza di melanoma ma non sono giunti a conclusioni univoche. Questi dati possono discordi possono essere imputati al fatto che la composizione del tessuto adiposo sottocutaneo rispecchia la dieta di un lungo periodo e risulta essere perciò più affidabile rispetto alle concentrazioni sieriche di lipidi, che si modificano invece più rapidamente in seguito a variazioni dietetiche.⁵⁸

Il consumo di alcol, soprattutto se abitudinario e in quantità moderata-elevata, viene ad oggi considerato un possibile fattore di rischio per l'insorgenza del melanoma cutaneo. I dati però non sono facilmente analizzabili poiché risulta complesso separare tale rischio da quello conferito dall'esposizione UV, anche in considerazione del fatto che molti pazienti riportano un aumentato consumo di alcolici durante attività di piacere all'aria aperta. È stato oltretutto rilevato

che questo contribuisce alla genesi di più episodi di ustioni solari severe, per cui ad oggi il dato sul consumo di alcool non viene ancora considerato definitivo.⁵⁹

Anche l'obesità viene suggerita come fattore di rischio, soprattutto per quanto riguarda il sesso maschile. Gli elevati livelli di leptina circolanti in pazienti sovrappeso, già noto fattore di rischio per altre neoplasie quali endometrio, mammella e colon, si sono dimostrati essere un fattore di rischio anche per l'insorgenza del melanoma.^{20,21}

La leptina infatti incrementa l'angiogenesi e la migrazione di alcuni tipi cellulari e può inibire l'apoptosi o agire come fattore di crescita. L'esercizio fisico sembrerebbe invece rappresentare un fattore protettivo per lo sviluppo del melanoma cutaneo.²¹

Dati sperimentali, su modelli murini di melanoma, sembrerebbero confermare infatti che elevati livelli circolanti di leptina stimolino la neoangiogenesi tumorale, mediante recettori che inducono la mobilitazione dei progenitori endoteliali dal midollo osseo, grazie all'attivazione della protein-kinasi AKT. I melanomi in tali animali sono risultati essere di maggiori dimensioni.⁶⁰

Bassi livelli circolanti di vitamina D erano in passato considerati un fattore di rischio per l'insorgenza del melanoma cutaneo ed una dieta ricca di vitamina D era considerata potenzialmente protettiva. Il pathway di segnalazione intracellulare conseguente all'attivazione del recettore della vitamina D risulta infatti implicato in numerosi processi, come apoptosi, risposta immunitaria e proliferazione cellulare.^{45,61}

Recenti metanalisi hanno però evidenziato come non sia ancora possibile ottenere un dato statisticamente significativo per quanto riguarda la correlazione tra livelli circolanti di vitamina D ed insorgenza di melanoma, ma affermano che possa essere descrivibile una relazione tra livelli di vitamina e spessore del melanoma alla diagnosi.⁶²

Ulteriori studi sembrano ad oggi necessari per confermare tali ipotesi.

Numerose molecole come il proantocianidina dei semi d'uva, l'epigallocatechina-3-gallato, il resveratrolo, l'acido rosmarinico, il licopene e il lattice di fico, sembrerebbero mostrare un effetto protettivo.⁶³

Anche il retinolo e polifenoli e gli acidi grassi ω -3 a lunga catena sembrano esercitare un effetto protettivo sull'insorgenza del melanoma cutaneo.⁶⁴⁻⁶⁶

Immunodepressione e uso di farmaci immunosoppressivi

L'immunodepressione e l'uso di farmaci immunosoppressivi rappresentano un importante fattore di rischio d'insorgenza di melanoma ed è stato ampiamente indagato in particolare analizzando la popolazione di pazienti sottoposto a trapianto d'organo.⁶⁷

Dopo trapianto per effetto della terapia immunosoppressiva iatrogena, il rischio di sviluppare NMSC risulta incrementato di 250 volte rispetto alla popolazione generale. È stato anche riscontrato un aumento delle recidive di melanomi trattati prima dell'intervento ed un incremento del rischio di insorgenza di nuovi melanomi.^{17,67}

Nei pazienti trapiantati i melanomi tendono a localizzarsi più frequentemente nel distretto testa-collo e appartengono alla tipologia lentigo maligna melanoma. Inoltre i melanomi in pazienti trapiantati sembrerebbero caratterizzarsi per uno spessore di Breslow maggiore, peggiorando pertanto la prognosi del paziente.⁶⁷

Un ulteriore elemento a sostegno del ruolo dell'immunosoppressione nello sviluppo del melanoma è rappresentato dal fatto che nei pazienti pediatrici sottoposti a trapianto le neoplasie cutanee rappresentano il secondo gruppo di tumori più frequenti ed il melanoma ne rappresenta in totale il 12%. Anche i pazienti affetti da HIV/AIDS risultano soggetti ad un maggior rischio di insorgenza di melanoma cutaneo soprattutto se di fototipo chiaro; l'aumento dell'incidenza sembrerebbe legata allo stato di immunocompromissione causata dal virus e non dalla terapia antiretrovirale assunta.⁶⁸

Il ruolo degli ormoni, in particolare quelli legati alla gravidanza, è stato oggetto di studio al fine di valutarne l'influenza nell'insorgenza del melanoma. Il melanoma rappresenta ad oggi il 31% della totalità delle neoplasie maligne che vengono diagnosticate durante la gravidanza. Recenti studi presenti hanno suggerito l'esistenza di un nesso causale tra la gravidanza e melanoma, ed alcuni di essi hanno mostrato come questi melanomi siano caratterizzati da una prognosi peggiore rispetto ai melanomi non correlati allo stato gravidico (pooled hazard ratio = 1.56, 95% confidence interval: 1.23–1.99) ed (hazard ratio = 1.17, 95% confidence interval: 1.03–1.33, p = 0.02). Il dato resta però ancora controverso.⁶⁹

È stato ipotizzato che alcune malattie infettive gravi contratte in giovane età e le vaccinazioni ripetute durante l'infanzia, ad esempio con bacillo di Calmette-Guerin (BCG), potrebbero giocare un ruolo protettivo verso l'insorgenza del melanoma cutaneo, anche nelle epoche successive della vita. Il meccanismo, probabilmente immunomediato, di questo effetto protettivo non è ancora completamente chiarito, ma sono in corso numerosi studi.⁷⁰

Anche gli antinfiammatori non steroidei (FANS) come l'acido acetil-salicilico, sono stati studiati nell'ottica di un possibile ruolo chemio-preventivo nei confronti dell'insorgenza del melanoma, come già riscontrabile in altri tumori, ad esempio nel carcinoma del colon-retto. Uno studio recente ha riportato l'effetto protettivo dell'aspirina (ma non dei FANS in genere) con una riduzione del rischio di insorgenza di melanoma del 21% e con beneficio che aumenta ulteriormente dopo 5 anni continuativi di assunzione.⁷¹

Le statine hanno dimostrato in vitro di possedere proprietà antiproliferative ed immunomodulatorie ed in modelli murini hanno manifestato effetti inibenti il processo di metastatizzazione. Studi in vivo più recenti hanno evidenziato che pazienti che assumono statine hanno una minore probabilità di avere metastasi al momento della diagnosi di melanoma (24.7% che assumevano statine vs 37.6% che non assumevano statine, riduzione del rischio assoluto = 12.9%). Questi risultati sembrano suggerire l'utilità delle statine come trattamento finalizzato a prevenire lo sviluppo di metastasi associate a melanoma.⁷²

I risultati degli studi presenti in letteratura non sembrano essere però concordi su tale argomento; tuttavia hanno anche rilevato un aumento nella sopravvivenza specifica a tre anni e uno spessore di Breslow ridotto nei pazienti che assumevano statine rispetto alla popolazione non sottoposta a tale trattamento.^{72,73}

Benefici, nella sopravvivenza, sono stati ipotizzati anche per gli utilizzatori di farmaci beta-bloccanti sulla base del riscontro di un effetto anti-angiogenico ed anti-migratorio di questi farmaci in vitro sulle linee cellulari di neoplasie umane ed animali.^{74,75}

PATOGENESI E BIOLOGIA MOLECOLARE

Il meccanismo patogenetico che sottende il melanoma risulta molto complesso ed ancora non del tutto chiarito. Si ipotizza che i melanociti accumulino lesioni genetiche in steps successivi, prima di essere in grado di formare una massa tumorale ed eventualmente metastatizzare a distanza. Alcune di queste mutazioni genetiche possono essere già presenti a livello germinale mentre altre vengono acquisite, determinando una combinazione di up-regulation e down-regulation di numerosi effettori molecolari a diversi livelli. Lo sviluppo di un tumore infatti può avvenire solo quando la cellula ha accumulato a livello genetico una serie di vantaggi nel suo accrescimento, principalmente attraverso mutazioni a livello di geni oncogeni e oncosoppressori.^{3,76}

Lo sviluppo della neoplasia è possibile solo dopo il sommarsi di multiple mutazioni, comportanti deregolazioni a livello cellulare, che avvengono con meccanismo genetico ed epigenetico e né

determinano un fenotipo maligno. Per quanto riguarda i cambiamenti a livello genetico, gli oncogeni possono venire up-regolati da duplicazioni di interi cromosomi, amplificazione genica, traslocazioni e mutazioni puntiformi attivanti. Gli oncosoppressori possono essere inattivati dalla perdita di interi cromosomi, da ampie delezioni, da delezioni nel contesto del gene stesso o da mutazioni puntiformi. Le alterazioni epigenetiche sono invece, per definizione, cambiamenti nell'espressione dei geni che non sono causati da modificazioni della sequenza dei nucleotidi ma da modificazioni covalenti dei residui amminoacidici degli istoni, o cambiamenti nello stato di metilazione delle citosine. La metilazione del promotore di un gene si associa a silenziamento del gene stesso ed il silenziamento epigenetico di un gene oncosoppressore, ad esempio, a livello funzionale è equivalente ad una mutazione inattivante o delezione dello stesso gene. La modificazione dello stato di metilazione delle citosine avviene con maggiore frequenza nel contesto delle cosiddette "isole-CpG".⁹⁰ Le mutazioni coinvolte nel processo di cancerogenesi possono essere anche classificate come "driver" o "passenger": le prime contribuiscono direttamente alla patogenesi della neoplasia, le seconde sono comunque accumulate durante la storia naturale della neoplasia, ma non contribuiscono direttamente al fenotipo maligno e non danno un vantaggio di sopravvivenza o moltiplicazione cellulare.^{76,77}

Per quanto riguarda la patogenesi del melanoma cutaneo, i melanociti possono mostrare la tendenza a raggrupparsi in nidi, creando un nevo melanocitico, che può poi assumere caratteristiche definite come displastiche e successivamente andare incontro a trasformazione in senso melanomatoso. Nonostante ciò, istologicamente si rileva un nevo melanocitico pre-esistente solo in una parte dei melanomi cutanei.^{33,77}

I geni e le vie molecolari ad oggi maggiormente caratterizzate nella patogenesi del melanoma sono: **CDKN2A** (via p16^{CDKN2A}-CDK4-RB e p14^{CDKN2A}-MDM2-p53), **NRAS-BRAF** (via delle MAPK e PI3K-AKT tramite l'attivazione di NRAS) **cKIT** e **MITF**.⁷⁸

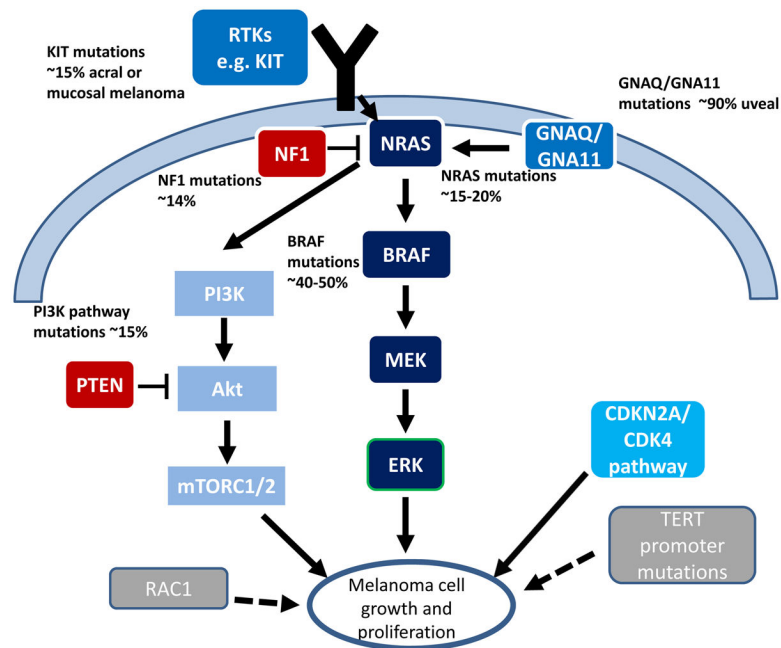


Figura 5. Vie molecolari implicate nella patogenesi del melanoma.

Si ritiene ormai da tempo che l'attivazione della via delle Map-kinasi (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*) rappresenti uno degli eventi iniziali cardine nella patogenesi del melanoma perchè capace di conferire una maggiore spinta proliferativa. Questa mutazione isolata non comporta però il completo sviluppo di neoplasia. Un secondo step fondamentale nella progressione di malattia è la perdita della funzionalità della via di CDKN2A (Cyklin Dependent Kinase Inhibitor 2A) che consente di inattivare programmi di senescenza cellulare a finalità oncosoppressive. L'attivazione della via della PI3K (Fosfatidil Inositolo 3 Kinasi), più comune nelle cellule di melanomi più avanzati, conferisce invece maggiori capacità invasive e metastatiche alla malattia.^{1,78}

Le vie di segnalazione sovraccitate svolgono fisiologicamente numerose funzioni, tra le quali la produzione di melanina, sostanza fondamentale per assorbire le radiazioni ultraviolette e ridurre il danno al DNA UV-mediato. L'attivazione nei cheratinociti, in risposta al danno della radiazione ultravioletta, della proteina p-53 rappresenta lo step iniziale nel processo di produzione melanica. Tale attivazione incrementa la trascrizione della pro-opiomelanocortina (POMC), precursore di ormoni come l' α -MSH (α -Melanocyte Stimulating Hormone) e l'ACTH (Adreno Corticotropic Hormone). L' α -MSH legandosi al recettore MC1R (Melanocortin 1 Receptor) dei melanociti, genera un incremento di cAMP (Adenosina Monofosfato Ciclico) intracellulare, tramite il quale viene stimolata la trascrizione di MITF (Microphthalmia-associated Transcription Factor), mediatore essenziale anche per la produzione di melanina e per garantire il funzionamento dei melanosomi. I melanociti sono inoltre dotati di meccanismi anti-

apoptotici che conferiscono resistenza al danno UV-mediato in condizioni fisiologiche. Il fattore di trascrizione MITF è il regista di questi meccanismi: i suoi livelli si alzano dopo esposizione alla radiazione UV, poichè media la trascrizione di geni anti-apoptotici BCL2, BCL2A1, ML-IAP e di geni implicati nella riparazione del DNA danneggiato.^{3,78,79}

La patogenesi del melanoma risulta essere molto complessa in essa infatti fattori ambientali e genetici si embricano con fattori legati al microambiente cellulare e a fattori di crescita.⁷⁸

Inoltre i fibroblasti, lo stroma, l'apporto ematico e la risposta immunitaria svolgono un importante ruolo nel favorire o inibire la crescita, l'invasione ed il processo di metastatizzazione.³³

Numerosi fattori di crescita e mutazioni ad essi associate esplicano la loro funzione, attraverso vie molecolari a partenza da recettori tirosin kinasici di membrana, attivando cascate di segnale che coinvolgono principalmente NRAS, BRAF e la via PI3K che regolano positivamente la sopravvivenza e la proliferazione cellulare. Durante la trasformazione neoplastica gli oncosoppressori facenti capo al gene CDKN2A e regolatori del ciclo cellulare come p-53, possono risultare mutati o by-passati favorendo pertanto una proliferazione cellulare indipendente dal controllo fisiologico.^{33,79}

Le mutazioni di BRAF ed NRAS vengono ritenute mutazioni precoci nella patogenesi del melanoma ma se isolate non risultano sufficienti a generare una neoplasia invasiva. Devono pertanto necessariamente sommarsi altre mutazioni interessanti la stessa o altre vie molecolari.⁷⁹

L'81% dei nevi melanocitici comuni manifesta infatti la mutazione di RAS mentre la mutazione BRAFV600E, la mutazione somatica di BRAF più frequente, è comunque presente nell'82% dei nevi melanocitici acquisiti. L'attivazione di NRAS o BRAF isolata, genera quindi un iniziale stimolo proliferativo, che viene però contenuto da programmi di senescenza e di arresto di crescita, probabilmente come risposta protettiva, mediata dall'oncosoppressore CDKN2A, e da altri sistemi di controllo del ciclo cellulare.^{3,26}

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

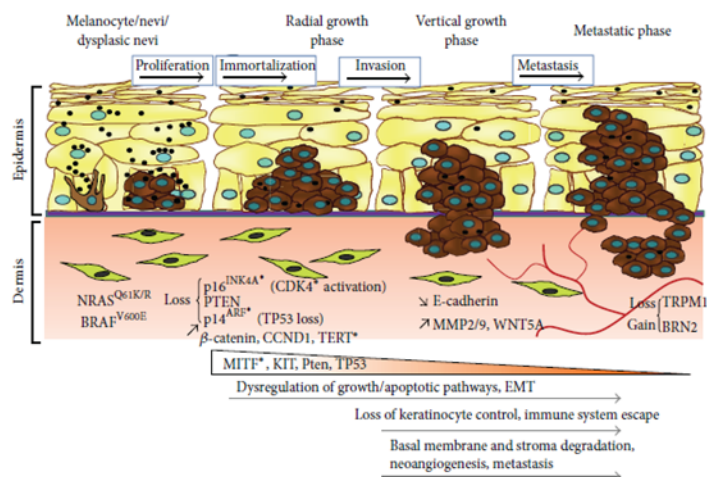


Figura 6: Modello di sviluppo ipotetico del melanoma (modello di progressione lineare). Immagine da “C.Bertolotto, Melanoma: From Melanocyte to Genetic Alterations and Clinical Options, 2013”.

La mutazione di NRAS si calcola sia presente dal 15 al 30% dei casi di melanoma, mentre la mutazione di BRAF dal 50% al 70%. Entrambe possono attivare la cascata delle MAPKinasi: RAS/RAF/MEK/ERK; a partire da questa via è anche possibile attivare il pathway della PI3K (vedi immagine 3). La mutazione di BRAF risulta fortemente associata all’esposizione solare intermittente in giovane età: i pazienti con mutazione di BRAF sono mediamente più giovani ed hanno un numero maggiore di nevi melanocitici. La mutazione di NRAS sembra invece correlare con una fotoesposizione cronica e ad alti livelli.⁷⁸⁻⁸⁰

Per quanto concerne la famiglia delle proteine RAS, quella più frequentemente coinvolta nella genesi del melanoma è NRAS.⁷⁷

Gli effettori delle proteine RAS fanno capo a tre vie di segnalazione intracellulare: la prima a partenza dal legame RAS/RAF, attivante cioè la via delle MAP-Kinasi, la seconda a partenza dal legame RAS/PI3-Kinasi, che attiva la via di segnalazione intracellulare della fosfatidil-inositolo-3-Kinasi, la terza a partenza dal legame di RAS con la proteina RAL-GEFS, che attiva una complessa via di segnalazione implicata nella crescita cellulare ancoraggio-indipendente e nella motilità cellulare.⁸¹

La famiglia delle RAF-kinasi consiste di tre isoforme (ARAF, BRAF e CRAF) e tutte possono attivare diverse kinasi intracellulari. BRAF è la proteina più frequentemente coinvolta nel melanoma e nel 90% dei casi viene colpita dalla mutazione V600E (sostituzione della valina con acido glutammico in posizione 600). Tale mutazione genera una attivazione costitutiva di ERK, evento finale della via delle MAPKinasi, indipendente dalla presenza o meno di fattori di crescita a livello extracellulare o della attivazione iniziale di RAS. Questo culmina nella trascrizione di geni crescita-correlati che stimolano la proliferazione.^{75,80}

Le mutazioni di BRAF si verificano più spesso nei siti anatomici esposti episodicamente a livelli intensi di radiazione UV e sono molto più rare nei siti non esposti, quali le mucose. Il ruolo dei raggi UV come agente causale non è comunque definitivamente chiarito, in quanto spesso le lesioni differiscono dai tipici dimeri di pirimidine, la mutazione più spesso correlata e riconducibile alla fotoesposizione.⁵³

L'attivazione di vie molecolari a partenza da NRAS/BRAF, se accompagnata da alcuni eventi che si ritengono essere più tardivi nella patogenesi del melanoma, come l'attivazione di alcuni fattori di trascrizione (TWIST1 ed altri) e dalla perdita di E-Caderine, è implicata anche nella transizione epitelio-mesenchimale che comporta un incremento delle proprietà di invasione e metastatizzazione e cattiva prognosi.^{3,80}

L'inattivazione degli oncosoppressori p16INK4a e p14ARF, codificati dal gene CDKN2A, è evento molto frequente. Risulta presente a livello germinale nel 20-40% dei casi di melanoma familiare, ma è anche un evento che si aggiunge alle mutazioni già citate in precedenza come alterazione somatica, acquisita durante la progressione del melanoma. Il 50% dei melanomi infatti presenta la perdita dell'espressione di p16INK4a ad esempio, ed i prodotti del gene CDKN2A possono non essere riscontrabili o essere funzionalmente non attivi sia a causa di mutazioni genetiche, che a causa di alterazioni epigenetiche come l'ipermetilazione presente nel 10-20% dei melanomi.⁷⁹⁻⁸¹

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

È stato dimostrato come la perdita di p16INK4a permetta di by-passare il programma di senescenza cellulare, volto a prevenire la proliferazione di cellule a rischio di trasformazione neoplastica e come la reintroduzione della sua espressione in cellule di melanoma generi differenziazione cellulare ed una regolazione negativa della proliferazione.³

La perdita della funzione di p16INK4a promuove l'attivazione delle Kinasi ciclina dipendenti CDK4 e CDK6, che comporta un'iperfosforilazione della proteina del retinoblastoma (pRB) e l'attivazione del fattore di trascrizione E2F1. Questo evento media la trascrizione di geni responsabili del passaggio alla fase S del ciclo cellulare, promuovendo in sintesi la proliferazione.^{3,81}

Inoltre la perdita dell'oncosoppressore PTEN (Phosphatase and Tensin homolog), in aggiunta alle mutazioni iniziali già descritte, favorisce ulteriormente la progressione neoplastica, mediante l'attivazione della via della PI3K.^{1,3}

La perdita di PTEN può avvenire mediante mutazioni inattivanti, ma molto spesso anche attraverso modificazioni epigenetiche, con ipermetilazione del promotore del gene, presente nel 62% dei casi.⁷⁸

Le mutazioni NRAS E BRAF sono in genere mutuamente esclusive, tranne rare eccezioni. Ad oggi le mutazioni di NRAS coesistono nel 9% con mutazioni attivanti la via della PI3K, mentre la compresenza di mutazioni di BRAF e PTEN è riportata nel 17% dei casi.³

Il fattore di trascrizione MITF (Microphthalmia-associated Transcription Factor) gioca, come già in parte discusso, un importante ruolo nella trascrizione di geni fondamentali in molti processi fisiologici e patologici del melanocita, come la sopravvivenza dei melanoblasti della cresta neurale, la sopravvivenza del melanocita a fronte di danno UV, l'inibizione dell'apoptosi, la migrazione cellulare e la proliferazione. Secondo il modello attuale, il livello di espressione di MITF è correlato a vari fenotipi cellulari, un decremento transitorio di espressione, ma non l'assenza totale di espressione, correla a caratteristiche assimilabili a quella di cellula staminale, livelli di espressione moderati correlano con una fase di proliferazione cellulare, alti livelli sono invece associati a differenziazione. L'inibizione sostenuta di MITF si associa alla senescenza cellulare. Nella patogenesi del melanoma, MITF può essere mutato sia a livello germinale che somatico. L'amplificazione del gene di MITF si ritrova ad esempio nel 10% dei melanomi primitivi, e nel 20% di quelli metastatici, ed è correlata ad una sopravvivenza a 5 anni peggiore per il paziente, conferendo alla neoplasia una maggiore capacità metastatica.^{3,79}

Fattori di trascrizione della stessa famiglia di MITF sono implicati nella patogenesi di altre neoplasie (carcinomi MIT-correlati) che condividono la refrattarietà alle terapie tradizionali, ed una prognosi negativa in caso di malattia non chirurgicamente curabile.^{82,83}

Per quanto riguarda il gene KIT, esso codifica per un recettore trans-membrana ad attività tirosin-kinasica, che lega il fattore di crescita delle cellule staminali SCF. L'attivazione di questa via di segnalazione intracellulare media la crescita cellulare, la proliferazione, l'invasione, la metastatizzazione e l'inibizione dell'apoptosi. Questo pathway, di solito attivo durante l'embriogenesi, viene riattivato in più della metà dei melanomi in stadio iniziale, ma molto spesso questa caratteristica viene persa durante la progressione neoplastica, soprattutto nei melanomi metastatici. Questo dato suggerisce che KIT possa detenere avere anche un'attività oncosoppressiva in circostanze ancora da delineare. È possibile riscontrare una stabile attivazione di KIT da parte di mutazioni genetiche solo nel 2-6% dei melanomi cutanei, ma

percentuali maggiori si riscontrano nei melanomi acrali, della cute esposta cronicamente al danno attinico e nei melanomi delle mucose. Molto spesso nei melanomi che hanno mutazioni di BRAF o NRAS, l'espressione di KIT è ridotta, e questo sembra facilitare la progressione neoplastica. D'altra parte è possibile identificare un sottogruppo di melanomi cutanei, negativi per mutazioni di BRAF o NRAS, che over-esprimono sia KIT che CDK4 come principali step per quanto riguarda la patogenesi del melanoma.³

Il gene oncosoppressore p-53 codifica per il fattore di trascrizione omonimo, che viene attivato dopo vari stimoli, come ipossia, danno al DNA o espressione di oncogeni, e controlla molti processi cellulari come l'apoptosi, la riparazione del danno al DNA, il metabolismo cellulare e la senescenza. P-53 regola negativamente l'hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), fattore di trascrizione che aumenta l'invasività delle cellule neoplastiche, p-53 inoltre può reprimere il processo della transizione epitelio mesenchimale, cruciale per l'acquisizione, da parte delle cellule neoplastiche, di un fenotipo con maggiori capacità metastatiche.⁸³

Il 50% delle neoplasie umane presenta mutazioni e delezioni di questo gene, ma nel melanoma sorprendentemente la percentuale è molto bassa (5% dei melanomi primari, e fino al 25% dei metastatici). Molti dei melanomi che mostrano mutazioni di p-53, non hanno comunque mutazioni di altri oncosoppressori rilevanti, come CDKN2A questo sta ad indicare che la mutazione di p-53, se presente, è sufficiente allo sviluppo della neoplasia. Recentemente è stato riscontrato che pur in assenza di mutazioni del gene p-53, in numerosi melanomi, sia primari che metastatici, la sua funzione viene comunque by-passata, grazie all'iperespressione di proteine come MDM2 (Mouse Double Minute 2 homolog) e MDM4, responsabili della degradazione di p-53 e di conseguenza dell'incremento delle proprietà di crescita, invasione e di metastatizzazione della neoplasia.³

Sia il melanoma che le cellule stromali nel contesto della neoplasia, esprimono metalloproteasi (MMP), cioè endopeptidasi zinco-dipendenti che si occupano principalmente del rimodellamento della matrice extracellulare.⁸³

Sono state riscontrate diverse MMP (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-14, MMP-15, MMP-16), e loro inibitori tissutali, denominati "TIMP", acronimo di "Tissue Inhibitor of Metalloproteinase, tra le quali TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3. Recenti studi hanno dimostrato come il bilancio funzionale tra MMP e TIMP sia importante nel determinare la progressione tumorale; la presenza di una netta iperespressione delle MMP correla con una maggiore densità microvascolare, con l'espressione di geni anti-apoptotici, e con un fenotipo maggiormente invasivo e metastatizzante da parte delle cellule neoplastiche. Le MMP maggiormente coinvolte nella progressione del melanoma sono la MMP-2 e MMP-9. L'espressione della MMP-2 da parte

delle cellule neoplastiche correla positivamente con la diffusione metastatica e con ridotta sopravvivenza. L'espressione della MMP-9 risulta maggiore durante la fase di crescita orizzontale del melanoma, per cui la sua espressione sembra essere una delle più precoci; è dimostrato inoltre che nel melanoma la presenza di MMP-9 dipende dall'attivazione della via della PI3K.^{3,84}

L'espressione di metalloproteasi da parte delle cellule tumorali è maggiormente concentrata nell'interfaccia tra la porzione più infiltrante del tumore e lo stroma circostante. Anche cellule non neoplastiche, che comunque partecipano al processo di progressione, esprimono importanti livelli di MMP, come le cellule endoteliali che prendono parte al processo di neoangiogenesi: tali enzimi sono infatti necessari a garantire la migrazione attraverso la matrice extracellulare, durante la formazione dei neovasi. Le MMP ed i TIMP possono anche agire come regolatori di vie di segnalazione intercellulare, mediando il clivaggio di citochine e fattori di crescita, implicati nello sviluppo della rete vascolare e nel suo mantenimento.⁸⁴

Transizione epitelio-mesenchimale (EMT)

Il processo di transizione epitelio-mesenchimale (EMT) è fisiologicamente attivo durante l'embriogenesi ma viene anche sfruttato dalle cellule neoplastiche, che attraverso la riattivazione di meccanismi biologici ben conservati trasformano il loro fenotipo da cellule epiteliali, immobili ed ancora dotate di adesività, in cellule che mostrano un fenotipo mesenchimale, dotate cioè della capacità di invadere e migrare in siti distanti dalla sede di origine dando il via al processo di metastatizzazione.⁸³

Alcune cellule, mediante questa trasformazione, possono anche acquisire proprietà che le rendono assimilabili a cellule staminali, dotate di alta resistenza ai trattamenti chemioterapici. Il programma genetico che guida la EMT viene attivato attraverso l'aumentata espressione di alcune proteine (SNAIL/SNAI2, SLUG, ZEB1, ZEB2/SIP1, TWIST, E47) che funzionano da fattori di trascrizione, attivando e silenziando una serie di geni al fine di promuovere la migrazione cellulare e diminuire l'espressione di molecole di adesione come le E-caderine.^{3,84}

La EMT si associa all'aumentata espressione di N-caderine, che si legano efficacemente alle cellule endoteliali, promuovendo l'invasione vascolare da parte delle cellule neoplastiche.⁸⁵

Il melanoma in questo processo risulta particolarmente efficiente, infatti è dimostrata l'espressione da parte dei melanociti trasformati di antigeni simili a quelli delle cellule endoteliali e di molecole di adesione, come L1CAM, espressa sia dall'endotelio che dai

melanociti. L'espressione di questa molecola sembra incrementare quantitativamente dal melanocita del nevo displastico, fino al melanoma invasivo e metastatico.⁵

Altre molecole importanti durante il processo di invasione e progressione sono le integrine, maggiormente espresse nel melanoma particolarmente a livello degli pseudopodi utilizzati dalle cellule durante l'invasione vascolare.⁷ Il processo della EMT viene modulato da diverse molecole di segnale e fattori di crescita quali TGF- β , EGF, FGF, HGF, bone morphogenetic proteins BMP, Notch). Il TGF- β ad esempio è capace di favorire il processo della EMT attraverso la trascrizione di geni specifici. L'espressione e la secrezione di TGF- β inizia precocemente durante la progressione del melanoma, ma incrementa durante tutto il processo ed alti livelli sono associati a spessori maggiori e ad un fenotipo cellulare invasivo. Il TGF- β , attraverso una complessa via di segnalazione, è anche in grado di incrementare la traslocazione nel nucleo di β -catenina, evento che dà il via alla trascrizione di molti geni implicati nella progressione del ciclo cellulare (tra cui ciclina D1 e MITF) o nella inibizione della funzione di p16INK4a. Il 30% dei melanomi presenta attivazione di questa via, che interagisce però in maniera complessa e non ancora del tutto chiarita con il processo di progressione del melanoma. Tra le varie vie di segnalazione implicate nella EMT, la via della PI3K può contribuire a innescare il processo nelle cellule del melanoma attraverso vari effettori, quali kinasi AKT (che in modelli animali promuove il passaggio da fase di crescita radiale a verticale), RAC1 (Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1), GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 Beta). Questi elementi, tramite vari meccanismi, incrementano la degradazione di p53, che rappresenta un ostacolo all'attuazione della EMT, ed aumentano l'espressione di SNAIL e SLUG, due fattori di trascrizione chiave per l'attivazione del processo della EMT. Tutto questo conferma come la via della PI3K possa conferire al melanoma caratteristiche di maggiore invasività, resistenza all'apoptosi e facilitarne la metastatizzazione.^{3,83,84}

Nuove scoperte stanno rapidamente arricchendo le conoscenze di biologia molecolare nel campo della patogenesi e progressione del melanoma, ampliando lo spettro dei processi noti: è ormai noto come modificazioni genetiche ed epigenetiche contribuiscano allo sviluppo del melanoma. Recentemente anche eventi post-trascrizionali, nello specifico la perturbazione dell'espressione dei micro-RNA cellulari (miRNA), si sono aggiunti come possibile tappa dello sviluppo di numerose neoplasie, tra le quali il melanoma. Lo studio dell'espressione dell'enzima ADAR1 (Adenosina Deaminase Acting on RNA 1) in cellule melanomatose, ha dimostrato come l'assenza di tale enzima sia frequente nelle neoplasie metastatiche, ma non negli stadi precedenti della malattia.⁸⁶⁻⁸⁸

Questo enzima converte l'adenosina in inosina su varie tipologie di RNA, compresi i miRNA, che in seguito a questo non terminano il loro percorso di maturazione e vengono quindi degradati o modificano la propria specificità di bersaglio.^{87,89}

L'enzima ADAR1 nelle cellule di melanoma contribuisce a regolare l'espressione di più di 100 geni, tramite la sua influenza su almeno 131 miRNA e la sua azione non si limita al semplice "editing" dei filamenti di RNA, ma è capace di condizionarne la maturazione con vari meccanismi. La perdita di questo enzima, riscontrabile nelle cellule di melanoma avanzato, è attribuibile all'azione di altri due miRNA, che legandosi all'mRNA codificante per ADAR1, ne abbassano i livelli. Infatti i miRNA, una volta maturati in frammenti a singolo filamento biologicamente attivi, agiscono principalmente legandosi agli mRNA della proteina da reprimere, inibendone la traduzione in polipeptidi ed accelerandone la degradazione.¹⁰⁴ L'incrementata espressione dei due miRNA che down-regolano ADAR1, è dovuta principalmente ad amplificazione dei geni che codificano per essi, ed alla loro ipometilazione, per cui entrano in gioco ancora una volta sia meccanismi genetici che epigenetici. La perdita dell'espressione di ADAR1 nelle cellule di melanoma metastatico è un evento comune, e contribuisce ad incrementare la progressione nel ciclo cellulare e la proliferazione, mutando anche l'aspetto morfologico delle cellule maligne, che assumono aspetto fusiforme, con emissione di pseudopodi. In modelli animali la perdita dell'enzima genera melanomi a rapida crescita, invasivi e con ampia necrosi centrale.⁸⁶⁻⁸⁹

CLASSIFICAZIONE MOLECOLARE DEL MELANOMA

La classificazione molecolare del melanoma è stata sviluppata grazie alle nuove conoscenze emerse in ambito di alterazioni molecolari implicate nella patogenesi della neoplasia e risulta oggi particolarmente utile in quanto consente di categorizzare i pazienti sulla base del beneficio ottenibile dalle nuove terapie a bersaglio molecolare (target therapy).^{89,90}

Tale approccio consente inoltre di superare i limiti di una classificazione squisitamente clinica e morfologica che non appare avere riscontri utili né in ambito diagnostico né terapeutico. Lo schema classificativo molecolare del melanoma proposto prevede l'integrazione di dati riguardanti lo status mutazionale della neoplasia con dati relativi la modalità di fotoesposizione.^{90,91}

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

Figura 7. Caratterizzazione molecolare delle principali tipologie di melanoma, in nero le alterazioni più comuni, in rosso le più rare, AMP: amplificazione genica, EXP: alterato livello di espressione della proteina rilevato con metodo immunohistochimico, MUT: mutazione genetica, CSD: aree con danno attinico cronico.

I melanomi che insorgono in zone sottoposte ad esposizione solare intermittente, sono caratterizzati nel 50% dei casi da mutazioni che coinvolgono i geni NRAS o BRAF. La mutazione più comune di BRAF è la sostituzione dell'acido glutammico con valina nell'amminoacido 600 (V600E) e rappresenta il 70-88% di tutte le mutazioni BRAF. Mutazioni meno comuni in BRAF includono V600K, V600R, e V600M, comprendenti rispettivamente l'11-20%, il 2-5% e l'1-4% delle mutazioni di BRAF. Altre alterazioni non V600 di BRAF si verificano in circa il 5% di tutti i melanomi, più comunemente ai codoni 466, 469, 597 e 601 e fusioni BRAF. I melanomi che insorgono sulla pelle con esposizione al sole intermittente hanno maggiori probabilità di avere una mutazione BRAF rispetto ai melanomi sulla pelle esposta al sole cronicamente, sulla pelle non esposta o sui melanomi delle mucose. Altre caratteristiche clinicopatologiche che sono state associate al melanoma mutante BRAF includono la giovane età, il melanoma a diffusione superficiale o nodulare, la presenza di mitosi, il melanoma primario occulto e localizzazione del melanoma a livello del tronco. La mutazione V600K correla con un'esposizione solare cronica, con melanoma localizzato a livello del distretto testa/collo ed in pazienti più anziani. Solo nel 3% dei casi la mutazione di BRAF è rappresentata dalla V600G/R.^{17,90}

Nelle zone sottoposte a danno attinico cronico, con marcata elastosi, la mutazione di BRAF è meno frequente. I melanomi che insorgono in zone con danno attinico cronico dimostrabile infatti sono caratterizzati dalla mutazione di NRAS nel 30-40% dei casi, o di KIT, che è presente nel 28% di questi.^{17,89}

La famiglia RAS comprende tre proto-oncogeni primari: NRAS, KRAS e HRAS, che regolano la proliferazione cellulare e l'apoptosi. Le mutazioni NRAS attivano costitutivamente MAPK, PI3K e altre vie di segnalazione cellulare causando la crescita, la proliferazione e la disfunzione

del ciclo cellulare. Le mutazioni NRAS si verificano in > 20% dei pazienti con melanoma cutaneo, più comunemente nel codone 61 e meno comunemente nei codoni 12 e 13. I melanomi con mutazioni NRAS sono associati a un decorso clinico aggressivo e a una prognosi sfavorevole.^{17,90}

KIT è una tirosin chinasi del recettore del proto-oncogene che si trova sulla membrana cellulare e si lega al fattore delle cellule staminali. Questo legame attiva la proteina KIT con conseguente attivazione di molteplici vie di segnalazione che influenzano la crescita, la proliferazione, la sopravvivenza e la migrazione delle cellule. Le mutazioni in KIT si verificano nell'1–3% di tutti i melanomi e si trovano più comunemente nell'esone 11 (L576P) o nell'esone 13 (K642E). Le mutazioni di KIT si trovano più comunemente nei melanomi delle mucose (15%) o acrali (15%) ed in aree di danno solare cronico (2-5%). Gli inibitori della tirosin-chinasi, in particolare imatinib, hanno dimostrato beneficio clinico nel trattamento del melanoma mutante KIT. Le risposte al trattamento nei pazienti con mutazioni dell'esone 11 si verificano nel range del 30-50%, sebbene la resistenza acquisita si manifesti tipicamente entro un anno.^{3,17}

Le mutazioni dei geni GNAQ/GNA11, codificanti per la sub-unità α e la sub-unità 11 di una proteina appartenente alla famiglia delle proteine G implicate nella trasduzione del segnale, sono caratteristiche del melanoma uveale, riscontrandosi nel 90% dei casi.⁹¹

Attualmente quindi la ricerca dello stato mutazionale per BRAF o NRAS è utilizzata ogni volta che si vuole classificare la neoplasia dal punto di vista molecolare per stabilire la possibilità di impiego delle terapie a bersaglio molecolare.¹⁰⁵

Generalmente le mutazioni di BRAF o NRAS sono mutualmente esclusive, per cui in caso di BRAF non mutato, è indicata la ricerca di mutazioni di NRAS, presenti nel 20% dei melanomi.¹⁷ Circa il 70% dei melanomi generalmente manifesta una delle due mutazioni; nella rimanente percentuale dei casi le mutazioni responsabili della progressione neoplastica rimangono non identificabili.⁹²

Attualmente non sono disponibili approcci terapeutici efficaci in caso di “melanomi triplo-negativi”, ovvero melanomi negativi per mutazioni di BRAF, NRAS e c-KIT.^{17,92,93}

Accanto all'attuale classificazione molecolare del melanoma basata principalmente su BRAF, NRAS e KIT, vanno delineandosi nuove alterazioni genetiche implicate nella patogenesi del melanoma non routinariamente ricercate in quanto ancora non completamente delineate. Tra queste va menzionata l'amplificazione del gene CCND1 (gene della ciclina D1), localizzato in posizione 11q13, che risulta in alcuni casi coesistere con la mutazione di BRAF o NRAS, conferendo alla neoplasia maggiore tendenza all'ulcerazione e all'invasività.^{91,93}

Mutazioni PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*) o delezioni profonde si verificano in <10% dei melanomi e attivano la segnalazione P13K / AKT. Queste mutazioni possono limitare la risposta all'inibizione di BRAF e sono stati anche implicati nell'esclusione dei linfociti T dal microambiente tumorale e nella mancanza di risposta all'immunoterapia.⁹⁴

Nei melanomi tripli negativi è stata identificata una mutazione a carico del gene della neurofibromatosi di tipo 1 responsabile della sintesi di NF1, una proteina che attiva la GTPasi che interrompe la segnalazione MAPK sottoregolando l'attività RAS e le mutazioni e / o la perdita di NF1 portano all'attivazione costitutiva della MAPK. Le mutazioni NF1 definiscono il terzo sottogruppo di melanoma genomicamente definito più comune e si verificano nel 14% dei campioni di melanoma TCGA, incluso fino al 70% dei campioni di tipo selvatico BRAF / NRAS. La maggior parte delle mutazioni NF1 porta a una perdita di funzione di questo soppressore tumorale, con circa l'80% dei pazienti che hanno una mutazione senza senso, un'inserzione o una delezione che porta a una proteina non funzionante.^{95,96}

Altre mutazioni potenzialmente rilevanti, oltre a quelle già elencate, in caso di melanoma *wild-type* per BRAF, NRAS e KIT, coinvolgono il gene PHIP (con mutazione che coinvolge sempre il *pathway* PI3K ed attivazione della protein-kinasi AKT), il gene CDK4, il gene ALK ed il gene ERBB4, mutazione quest'ultima riscontrata nell'11.6% dei melanomi tripli negativi.⁹⁴⁻⁹⁶

Melanomi negativi per mutazioni comuni di BRAF, ed anche melanomi considerati triplo negativi, potrebbero essere portatori di mutazioni più rare, inclusa la recente scoperta di proteine di fusione di BRAF. Tali proteine di fusione consistono in un ibrido tra il dominio chinasi di BRAF e la porzione N-terminale di altre proteine, attivando la via delle MAP-kinasi.⁹⁶

Nella pratica clinica si procede in genere con lo studio dello stato mutazionale di BRAF ed in caso di negatività, di NRAS, mentre la valutazione dello stato mutazionale di c-KIT è riservata ai casi di melanomi acrali e mucosali, previa valutazione dello status di BRAF ed NRAS.⁹⁴

PRECURSORI E CARATTERISTICHE CLINICHE

Come precedentemente esposto, il 75% dei melanomi cutanei insorge su cute sana in assenza di lesioni, mentre il 25% insorge da lesioni pre-esistenti, considerabili clinicamente precursori del melanoma. Rimane da stabilire tuttavia se tali precursori siano sempre da considerare anche biologicamente lesioni precancerose o se l'insorgenza del melanoma su una pre-esistente lesione sia interpretabile anche come un fatto statistico, dovuto alla semplice presenza di un numero

elevato di melanociti. Esistono tre tipi di lesioni pigmentate considerabili precursori del melanoma: nevi melanocitici congeniti, nevi melanocitici acquisiti, e nevi displastici o atipici.¹¹²

I nevi melanocitici congeniti sono clinicamente evidenti alla nascita, compaiono entro alcuni mesi da essa; si presentano come lesioni a margini netti che in genere mostrano una crescita dimensionale durante la fase di accrescimento del bambino, hanno superficie che col tempo può tendere a diventare rugosa, presentano spesso peli terminali nel loro contesto, e pigmentazione da marrone chiaro a scura.⁹⁷

Istologicamente, i melanociti sono disposti più in profondità rispetto ai nevi melanocitici acquisiti, spesso nei due terzi inferiori del derma e raramente anche nel grasso sottocutaneo. Possono essere isolati, disposti in aggregati regolari, o attorno a fibre collagene, attorno ad annessi, o talvolta a vasi e strutture nervose. Il rischio di evoluzione dei nevi congeniti in melanoma è assodato e strettamente dipendente dalle dimensioni. Per i nevi congeniti giganti si attesta tra il 5-10% mentre per le lesioni di minori dimensioni risulta più difficile da quantificare con precisione ma sembrerebbe essere compreso tra il 2.6% al 4.9% per i nevi di diametro inferiore ai 4.5 cm.^{6,97}

Il melanoma su nevo congenito insorge più spesso dalla giunzione dermo-epidermica, in maniera simile a quanto riscontrabile nei nevi acquisiti; è un evento in ogni caso estremamente raro prima della pubertà, contrariamente a quanto accade nei nevi congeniti di maggiori dimensioni.⁹⁷

Il nevo displastico o atipico, descritto per la prima volta nel 1978 da Clark, è caratterizzato da lesioni più spesso localizzate al tronco o agli arti, presenti in soggetti con o senza familiarità per melanoma. La diagnosi clinica di nevo displastico si basa sulle seguenti caratteristiche: diametro maggiore o uguale a 5mm, bordo irregolare con asimmetria della forma, contorni sfumati, pigmentazione disomogenea. Almeno tre dei criteri menzionati sono richiesti per poter porre diagnosi di nevo displastico, criteri in parte sovrapponibili ai criteri "ABCDE" utilizzati per la diagnosi clinica di neoformazione melanocitaria atipica.^{6,97}

Esiste infatti *un continuum* tra le caratteristiche del nevo atipico e quelle del melanoma in situ, in fase di crescita radiale precoce, rappresentativo della progressione esistente da nevo atipico a melanoma.⁹⁸

Il nevo displastico viene considerato un possibile precursore del melanoma; circa il 20% dei melanomi insorge infatti su nevo displastico. Tuttavia tale evento è considerato piuttosto raro; si stima che 1:30.000-40.000 nevi displastici evolva in melanoma e la maggioranza di essi pertanto non si modifica o tende alla regressione.⁹⁹

Il nevo displastico è considerabile tra i marker di aumentato rischio per l'insorgenza del melanoma, infatti individui con numerosi nevi displastici possono avere anche meccanismi di

riparazione del DNA deficitari, o un incremento di feomelanina, che si è dimostrato capace di aumentare lo stress ossidativo cellulare, in parte implicato nel processo di cancerogenesi.¹¹² Queste lesioni insorgono più spesso dopo la pubertà e manifestano tendenza a rimanere relativamente dinamiche nell'età adulta, potendo anche regredire. Al contrario i nevi melanocitici acquisiti si accrescono fino ad un diametro che può raggiungere anche valori simili a quelli del nevo displastico, ma vanno successivamente incontro ad un arresto di accrescimento: la proliferazione cellulare alla giunzione dermo-epidermica si esaurisce ed i melanociti migrando nel derma vanno incontro a senescenza.^{6,99}

I nevi melanocitici acquisiti solitamente compaiono entro il primo anno di vita e possono crescere in numero e dimensione, soprattutto durante la fase di accrescimento dell'individuo, usualmente non superando i 5mm di diametro. Come già esposto, all'aumentare del numero dei nevi melanocitici, si assiste ad un aumento del rischio di melanoma: in uno studio che ha analizzato istologicamente 289 casi di melanoma cutaneo di spessore di Breslow inferiore o uguale ad 1mm, nella metà dei casi è stata riscontrata la presenza di una componente benigna pre-esistente nel contesto della lesione riconducibile nel 56% dei casi a nevi displastici, nel 41% a nevi melanocitici acquisiti e nel 3% a nevi congeniti.¹⁰⁰

Il rischio stimato per un nevo melanocitico acquisito di andare incontro a trasformazione melanomatosa entro l'ottantesimo anno di vita dell'individuo è dello 0.03% nei maschi e dello 0.009% nelle femmine.^{6,100}

Nei nevi melanocitici acquisiti spesso risiedono mutazioni genetiche come quella di BRAF, riscontrabile nel 70-80% dei nevi acquisiti, che tuttavia isolatamente non risultano sufficienti a determinare lo sviluppo del melanoma.¹⁰⁰

Caratteristiche cliniche

Il sospetto clinico di melanoma cutaneo viene in genere posto sulla base del riconoscimento di alcune caratteristiche fenotipiche della lesione che comprendono la disomogenea distribuzione della pigmentazione, l'irregolarità dei bordi, l'asimmetria della lesione, associate a modificazioni nel tempo della lesione stessa. La formula "ABCDE" che viene rutinariamente utilizzata nella pratica clinica riassume infatti gli elementi citati comprendendo:¹⁷

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

B: Bordi: irregolari, indentati

C: Colore: disomogeneo

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

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

Tali caratteristiche possono essere presenti tutte o solo in parte e la presenza anche solo di una di esse pone il sospetto di lesione melanocitaria con caratteri di malignità. Anche la presenza di una lesione che presenta caratteristiche morfologiche, in particolare la pigmentazione, che differiscono notevolmente da quelle dei restanti nevi melanocitici dello stesso individuo, rappresenta un indizio di lesione melanocitaria sospetta ed è indicato come segno del “brutto anatroccolo”.¹⁷

Altro elemento di sospetto è rappresentato dalla presenza di un nevo solitario, clinicamente atipico, in un paziente con numero molto basso di nevi o senza lesioni nevice. L’insorgenza di una lesione pigmentata in epoca avanzata, dopo il trentesimo anno di età, è un ulteriore criterio di sospetto clinico.^{17,101}

È stata anche proposta una check-list in sette punti, la Glasgow check-list, che comprende tre criteri maggiori (1-3) e quattro minori (4-7):⁶

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

In questo caso anche la presenza di un solo criterio maggiore depone per una lesione meritevole di asportazione chirurgica ed i criteri minori rafforzano il livello di sospetto.¹⁷

Anche per i melanomi nodulari è stata proposta una classificazione indicata con l’acronimo anglosassone “EGF”:^{17,101}

E: Elevated, ovvero recente insorgenza ed elevazione

G: Growth, ovvero rapida crescita

F: Firm, ovvero consistenza dura

I melanomi, in particolare le lesioni con diametro ridotto, possono anche non mostrare alcuna caratteristica rilevante all'ispezione clinica e rivelare la loro natura solo attraverso l'esame dermatoscopico o videodermatoscopico.^{17,101-103}

Questi atti diagnostici sono in grado di migliorare la performance nel riconoscimento precoce della neoplasia, mostrando un incremento delle diagnosi corrette almeno del 15%.¹⁰³

La diagnosi clinica di melanoma cutaneo è fortemente condizionata dall'esperienza, per cui la sensibilità mostra valori oscillanti tra il 50 e l'85%; è dimostrato che il dermatologo è comunque lo specialista che offre la possibilità di diagnosticare il maggior numero di lesioni in stadio precoce di malattia e quindi con prognosi migliore.¹⁷

Diverse lesioni benigne possono mostrare caratteristiche morfologiche che le pongono in diagnosi differenziale con il melanoma cutaneo, tra cui la lentigo solare, la lentigo senile, la cheratosi seborroica, lesioni vascolari, nevi atipici o nevi melanocitici, soprattutto se a rapida crescita o intensamente pigmentati come il nevo di Spitz o di Reed, il nevo blu, il carcinoma basocellulare pigmentato e la cheratosi attinica pigmentata.¹⁰³

L'ematoma sub-ungueale o l'emorragia intra-epidermica, entrano invece in diagnosi differenziale con il melanoma ungueale.^{2,6}

La morfologia del melanoma cutaneo è legata in parte all'istotipo ed in parte alla fase di sviluppo. È possibile distinguere clinicamente un melanoma piano, un melanoma cupoliforme, ed un melanoma piano-cupoliforme.^{2,6}

Il melanoma piano è quello di più frequente osservazione (80% dei casi), si presenta in genere come una lesione irregolare, spesso di diametro maggiore a 6mm, che in anamnesi risulta essersi accresciuta nei mesi precedenti in senso centrifugo (crescita orizzontale). È questa la forma di melanoma meglio descritta ed identificata dai criteri ABCDE.^{2,6,17}

Può essere non palpabile o palpabile: la forma palpabile risulta leggermente rilevata sul piano cutaneo, può essere inferiore al centimetro o risultare più esteso. In caso di lesione palpabile, possono accentuarsi gli aspetti precedentemente descritti, con asimmetria più marcata, maggiore irregolarità dei contorni, colore disomogeneo, aspetto finemente desquamante, talora presenza di aree erose, con squamo-croste. A volte è possibile notare aspetti regressivi, con aree bianco-grigie, o dello stesso colorito della cute sana circostante, che compaiono nel contesto della neoplasia, creando a volte aspetti anulari-arciformi. Talora, se la regressione è marcata, la lesione può non essere più apprezzabile. In questi casi la sua natura può rivelarsi anche anni dopo, con la comparsa di metastasi linfonodali o sistemiche.¹⁰³

Il melanoma nodulare è meno frequente (18% dei casi), coinvolge la su cute sana, e tende alla crescita in altezza (fase di crescita verticale). Si presenta generalmente come papula o nodulo, di aspetto emisferico, regolare ed a superficie liscia, di colore spesso bruno e bluastro; talvolta può però presentare pigmentazione distribuita in maniera irregolare, fino alla completa assenza di pigmentazione (melanoma amelanotico). In questo caso la diagnosi clinica è più complessa, può essere presente alla base una sfumatura nerastra (fenomeno della “fuga del pigmento“) di ausilio diagnostico. Il melanoma amelanotico insorge più frequentemente in pazienti anziani. La presentazione clinica più frequente è quella papulo-nodulare, esofitica, più comune in zone senza foto esposizione e senza danno attinico. Altre possibili manifestazioni sono quelle in forma di placca, oppure in forma simil-angiomatosa, a volte desquamante. Meno frequente è l’aspetto maculare, eritematoso, con alterazioni della superficie epidermica, con possibile riscontro anche in zone fotoesposte. In altri casi appare come una placca ipercheratosica, che può ricordare una verruca, altre volte ancora sotto forma di un nodulo esofitico, spesso eroso in superficie. Data l’estrema variabilità dell’aspetto clinico, il melanoma amelanotico è definito “il grande simulatore” e ad esso è associato un rischio consistente di non essere riconosciuto nelle sue fasi iniziali e pertanto di non essere asportato chirurgicamente con conseguente peggioramento della prognosi del paziente. La diagnosi differenziale con diverse lesioni melanocitarie e non, sia benigne che maligne (carcinoma a cellule di Merkel, cheratoacantoma, emangioma, granuloma piogenico) è spesso difficile ed un aiuto importante viene dalla valutazione dermoscopica, soprattutto dall’esame del pattern vascolare. Il melanoma piano-cupoliforme è rappresentato dall’insorgenza, nel contesto di un melanoma piano (palpabile o meno), di un’area papulo-nodulare. Si tratta di un’evenienza frequente, che può presentarsi anche dopo anni dalla prima comparsa della lesione piana. È interpretabile quindi come un aspetto di progressione della neoplasia. Si ricorda inoltre che tutte le varianti cliniche di melanoma possono essere o meno circondate da lesioni satelliti, piccoli noduli bruno-nerastri o anche acromici, situati in prossimità della lesione principale, considerati un aspetto della metastatizzazione per via linfatica della neoplasia.^{2,104}

Tutti i nevi melanocitici, congeniti o acquisiti, dopo un periodo di lenta crescita rimangono in genere stazionari per tutta la vita ma il loro controllo deve essere comunque effettuato, se non ci sono modificazioni rapide e sostanziali (ed il soggetto non presenta particolari fattori di rischio per lo sviluppo del melanoma) con cadenza almeno biennale. La distribuzione omogenea del colore, la regolarità delle caratteristiche geometriche e le scarse variazioni temporali del nevo sono indici di benignità. È chiaramente necessaria particolare attenzione ai pazienti che presentano numerosi nevi melanocitici acquisiti di diametro superiore a 5mm o nevi

cl clinicamente atipici. La presenza o la modificazione dei parametri ABCDE anche nel contesto di un nevo acquisito, così come la comparsa di sintomi riferibili alla lesione, come il prurito, suggerisce fortemente la necessità di una valutazione specialistica. Nel caso di un nevo congenito rappresentano elementi di sospetto anche la comparsa sul bordo di una macchia nerastra, o l'insorgenza di un nodulo acromico o pigmentato nel contesto della lesione nevica.³⁴ Nel caso di lesioni rilevate sospette (papulose o nodulari), in particolare negli anziani, i parametri di valutazione sono: recente insorgenza, rapida crescita, consistenza dura della lesione ed elevazione. Questi parametri sono sintetizzati nell'acronimo anglosassone di EGF (Elevated, Growth, Firm). Va tenuto comunque in considerazione che nevi melanocitici benigni possono modificare il loro aspetto anche in relazione ad altre cause tra cui le più frequenti sono i traumi, le follicoliti, la gravidanza e l'esposizione solare.^{104,105}

CLASSIFICAZIONE ANATOMO-PATOLOGICA

Classificazione istologica del melanoma cutaneo

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

- melanoma a diffusione superficiale;
- melanoma nodulare;
- melanoma su lentigo maligna;
- melanoma acrale-lentiginoso.^{2,17,26}

Tutti gli istotipi si caratterizzano per una fase di crescita orizzontale, eccetto il melanoma nodulare. Le due varianti più diffuse di melanoma cutaneo sono il melanoma a diffusione superficiale e il melanoma nodulare, che nel complesso costituiscono circa l'80% della totalità dei melanomi.¹⁰⁴

Alle varianti sopra menzionate si affiancano altri istotipi considerati rari, classificati separatamente dall'OMS come varianti rare di melanoma e che comprendono:

- Melanoma desmoplastico,
- Melanoma neurotropico,
- Melanoma nevoide (o melanoma a deviazione minima),
- Melanoma spitzoide,
- Melanoma angiotropico,
- Nevo blu maligno,
- Melanoma animal type
- Melanoma ipo/amelanotico,
- Melanoma verrucoso,
- Melanoma polipoide,
- Melanoma su nevo preesistente,
- Melanoma in regressione^{2,6,105}

Esistono anche altre entità, non universalmente riconosciute come il melanoma metaplastico, *signet-ring*, a piccole cellule, rabdoide, melanoma a *balloon cell*. Sono melanomi che presentano morfologia o antigeni più spesso riscontrati in lesioni di altra derivazione (epiteliale, osteocartilaginea o muscolare liscia) e si associano spesso a difficoltà diagnostiche, anche per la possibile mancanza di espressione di antigeni comunemente presenti nelle cellule di derivazione melanocitaria (proteina s100 ed HMB45).¹⁰⁵

Il sottotipo istologico non è considerato ad oggi un fattore prognostico indipendente. Il valore prognostico del sottotipo istologico di non è stato ancora definito con certezza, nonostante vi siano alcune eccezioni. Ad esempio i melanomi primari con sottotipo desmoplastico hanno un rischio inferiore di metastasi linfonodali e a distanza, ma si associano potenzialmente ad un rischio più elevato di recidiva locale. Allo stesso modo, il pattern lentigo maligna-melanoma che è comunemente osservato nel distretto testa e collo, può essere associato ad estensione periferica e periannessiale subclinica, tanto da necessitare margini chirurgici più ampi.^{17,105}

Melanoma a diffusione superficiale

Il melanoma a diffusione superficiale è la variante più comune di melanoma e rappresenta circa il 70% dei casi. Insorge in pazienti di giovane età (mediana 50 anni) rispetto a quanto rilevabile per il melanoma nodulare e lentigo maligna melanoma, che presentano mediamente età più avanzate. Coinvolge frequentemente le sedi anatomiche interessate da esposizione solare intermittente, quali il tronco, il dorso e le estremità.^{26,103}

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

un notevole incremento dell'attività mitotica, con conseguente aumento del rischio di metastatizzazione e prognosi peggiore.²⁶

La variante verrucosa del melanoma a diffusione superficiale si caratterizza per la presenza di ipercheratosi e dall'iperplasia dell'epidermide. La lesione entra in diagnosi differenziale con lesioni tipicamente verrucose quali verruca virale, oltre che con neoplasie cutanee di derivazione cheratinocitaria.¹²

Melanoma nodulare

È caratterizzato da età d'insorgenza più avanzata rispetto al melanoma a diffusione superficiale, (mediana di 70 anni) e si associa data la crescita verticale a prognosi peggiore. Si localizza più frequentemente a livello del tronco, anche se può localizzarsi in qualsiasi distretto corporeo. Macroscopicamente si presenta come nodulo a rapida crescita dal profilo esofitico. L'epidermide sovrastante può essere atrofica e/o ulcerata. Clinicamente il melanoma nodulare entra in diagnosi differenziale con il carcinoma basocellulare pigmentato. Per definizione istologica, le cellule melanomatose possono essere presenti nell'epidermide sovrastante ma non si estendono per più di 3 creste epidermiche oltre ai margini laterali della componente nodulare. La componente dermica è caratterizzata da teche e/o aggregati confluenti, non mostranti fenomeni di maturazione. Si possono osservare melanociti a morfologia epitelioida, fusata, nevoide o pleomorfa. Le cellule neoplastiche mostrano espressioni di ipercromasia e nucleoli prominenti. Non è possibile individuare in questa forma una porzione concomitante con riconoscibile fase di crescita in situ od orizzontale. È in uso la tendenza di utilizzare impropriamente il termine "nodulare" per descrivere ogni melanoma in cui è presente una componente rilevata, ma va ricordato che anche i melanomi a diffusione superficiale, la lentigo maligna/melanoma, o il melanoma lentiginoso-acrale, possono tutti sviluppare nel corso della crescita laterale aree nodulari, senza però poter essere ascrivibili istologicamente a tale categoria. Si ritiene che la velocità di progressione del melanoma nodulare sia maggiore rispetto a quella del melanoma a diffusione superficiale con conseguenti ripercussioni sulla prognosi del paziente.^{104,105}

Lentigo maligna e lentigo maligna melanoma

La lentigo maligna melanoma è una variante clinica di melanoma che coinvolge aree cronicamente fotoesposte, come la regione testa/collo e l'avambraccio. Tipicamente coinvolge pazienti di età avanzata (età mediana 80 anni) e si presenta come lesione maculare di ampie

dimensioni, aree di pigmentazione disomogenea e contorni irregolari. Tale lesione può diventare rilevata sul piano cutaneo, qualora la neoplasia inizi l'invasione del derma sottostante (lentigo maligna-melanoma). Istologicamente è visibile una proliferazione lentiginosa, non superante la membrana basale, di melanociti atipici su cute che spesso mostra danno attinico cronico (lentigo di Hutchinson).¹²⁸

L'epidermide si caratterizza per elastosi solare ed è frequentemente presente assottigliamento del derma. È riscontrabile l'estensione della proliferazione melanocitaria nel contesto delle porzioni più superficiali dell'epitelio dei follicoli piliferi e nei dotti sudoripari, e la presenza di occasionali melanociti giganti multinucleati. Il termine lentigo maligna si riferisce esclusivamente alla fase iniziale, in cui la neoplasia melanocitaria mostra crescita intra-epidermica o in situ. È possibile la progressione di una lentigo solare in lentigo maligna, in tal caso si assiste ad ingrandimento, modificazione dei margini ed in genere ad un aumento della pigmentazione. Durante la sua evoluzione nel tempo, la lentigo maligna può presentare aree di regressione, spesso centrolesionali, con margini che invece continuano ad estendersi.^{2,6}

Quando successivamente la crescita si estende nel derma superando la membrana basale, si è in presenza di una fase di crescita verticale e si utilizza dunque il termine di lentigo maligna-melanoma. La componente invasiva è costituita da melanociti atipici di forma spesso fusata, disposti in aggregati e teche di dimensione variabile, con concomitante scarso infiltrato infiammatorio con melanofagi.^{2,26}

Caratteristica della lentigo maligna melanoma è la diffusione di melanociti atipici che si estendono anche a considerevoli distanze dai margini visibili della lesione, motivo per cui frequenti sono le recidive locali legate al fenomeno del "campo di cancerizzazione". Raramente nel contesto di una lentigo maligna si può sviluppare un melanoma desmoplastico che appare come nodulo duro alla palpazione e fisso, nel contesto di una macula pigmentata.¹⁰⁵

Melanoma lentiginoso-acrale

Come si evince dalla denominazione, tale variante di melanoma coinvolge esclusivamente le sedi acrali incluse le regioni plantari, palmari e sub ungueale. Rappresenta il 10% dei melanomi nei caucasici, ma ben il 50% dei melanomi cutanei che insorgono nelle popolazioni a fototipo più scuro. È una variante istologica particolarmente diffusa in Asia ed in particolare in Giappone, per cui per questa entità clinico-patologica l'incidenza risulta essere molto variabile a seconda del gruppo etnico. Generalmente si presenta come una chiazza pigmentata a lenta crescita con aspetto istopatologico peculiare: la lesione si manifesta inizialmente con una fase di crescita

orizzontale, generalmente estesa, che può essere anche molto lenta; la fase di crescita radiale risulta simile a quella osservabile nella lentigo maligna ed è caratterizzata da estensione considerevole, infatti escissione frequenti sono le recidive secondariamente ad escissione chirurgica.¹⁰⁶

Durante la fase di crescita radiale è presente acantosi, con strato corneo ispessito, ed allungamento delle papille dermiche; si associa comunemente un infiltrato linfocitario a livello della giunzione dermo-epidermica. I melanociti mostrano prominenti e lunghi processi dendritici e spesso coinvolgono i dotti sudoripari, estendendosi nel derma reticolare profondo. In fase di crescita verticale, gli aggregati neoplastici sono costituiti da melanociti di forma fusata, sullo sfondo di una spiccata desmoplasia.¹⁰³

Nelle fasi iniziali l'area a crescita verticale invasiva può però risultare molto esigua e difficile da identificare, richiedendo quindi numerose sezioni istologiche.¹²⁸ Il melanoma sub-ungueale si presenta nella maggioranza dei casi con una melanonichia, ovvero in fase iniziale con un banda avente la tonalità del nero-marrone a livello del letto ungueale e nelle fasi avanzate con modifica della conformazione dell'unghia e positività del segno di Hutchinson, consistente nell'invasione clinicamente visibile del perionichio.^{103,106}

Melanoma desmoplastico

Rappresenta l'1% di tutti i melanomi ed è considerato la più comune entità istologica tra le varianti rare.^{2,6} Si presenta come nodulo espansivo fibroso, composto da cellule fusate, fibroblasto-simili, con scarso citoplasma e nucleo ipercromatico, con variabile atipia citologica, disposte tra le fibre collagene dermiche in nidi ipercromatici ed immerse in abbondante stroma fibroso. Spesso concomita nel contesto o alla periferia della lesione tumorale un infiltrato infiammatorio nel e marcata elastosi solare. Peculiare è il neurotropismo riscontrabile nel 30% dei casi; l'infiltrazione perineurale è comune, soprattutto nei melanomi del distretto testa-collo, e può essere associata a dolore severo.¹⁰⁵

Fattori prognostici

La sopravvivenza dei pazienti affetti da melanoma cutaneo dipende principalmente dallo stadio del tumore al momento della diagnosi. Attualmente i principali fattori utilizzati per stabilire la prognosi della patologia sono i parametri istologici; ad essi si associano quelli molecolari che trovano al momento un utilizzo clinico contenuto. L'attuale sistema di classificazione del

melanoma cutaneo permette di predire con una certa accuratezza la storia clinica, anche nei casi diagnosticati in fase precoce di malattia. Tuttavia si stima che il 5% dei pazienti affetti da melanoma con spessore ≤ 1 mm, solitamente a prognosi favorevole, possono andare incontro a processi di recidiva e metastatizzazione. Questo dato sottolinea la necessita clinica di poter disporre di indicatori molecolari in grado di meglio caratterizzare la lesione neoplastica e stratificare il quindi il rischio di progressione con maggiore precisione. Identificare sottogruppi di pazienti a rischio di progressione al momento della diagnosi iniziale consentirebbe anche di meglio pianificare la gestione terapeutica del caso con ripercussioni favoreli sulla sopravvivenza. I fattori prognostici del melanoma cutaneo non sono dunque rappresentati solo da fattori istologici ma anche dalle caratteristiche cliniche del paziente e dallo status genetico della neoplasia.¹⁰⁷

Fattori prognostici istologici

Il sottotipo istologico, per quanto importante nel momento diagnostico, non è oggi considerato tra i fattori prognostici, contrariamente a quanto si riteneva in passato. Secondo la Melanoma Taskforce della AJCC i 3 più importanti fattori progostici del melanoma sono rappresentati da: spessore di Breslow, ulcerazione ed indice mitotico. L'indice mitotico, contenuto nella precedente edizione dell'AJCC (VII), non risulta più incluso nell'ottava edizione dell'AJCC. Le principali raccomandazioni per la gestione clinica delle lesioni primarie e del trattamento della malattia metastatica non tengono tuttavia in considerazione l'istotipo di melanoma.^{17, 108,109}

Unica eccezione è rappresentata dal melanoma desmoplastico, poiché possiede un comportamento biologico assimilabile a quello di un sarcoma, con frequente disseminazione per via ematogena e precoce coinvolgimento polmonare, anziché diffusione linfatica. In questa forma, a causa della maggiore tendenza a sviluppare recidiva locale i pazienti sono sottoposti anche a radioterapia post-operatoria. L'informazione riguardante l'istotipo quindi, insieme ai dati clinici, assume in alcuni casi un peso validità nella gestione del paziente, specialmente se la neoplasia interessa sedi anatomiche critiche per estetica e/o funzione.^{17,105,108}

Fase di crescita

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

principali: fase di crescita radiale in situ, fase di crescita radiale invasiva, fase di crescita verticale, seguita da metastatizzazione, secondo un modello sequenziale di progressione.^{6,17}

Questi vari steps sono identificabili all'esame istologico, e predittivi di un differente potenziale metastatico. La fase radiale è considerata "non tumorigenica", caratterizzata cioè dalla proliferazione di melanociti neoplastici nell'epidermide e/o nel derma papillare, singoli o a piccoli nidi, ma senza formazione di un nodulo tumorale; per definizione tutti i melanomi in situ possiedono fase di crescita radiale. Quando il melanoma invade il derma, potrebbe ancora avere solo fase di crescita radiale, a singole cellule, o a piccoli nidi senza figure mitotiche.^{17,108,109}

La fase di crescita verticale rappresenta la fase "tumorigenica", nella quale il melanoma acquisisce maggiore capacità di metastatizzare, ed è caratterizzata morfologicamente dalla presenza di noduli espansivi, di dimensioni maggiori rispetto agli aggregati intraepidermici e/o dalla presenza di figure mitotiche nella componente invasiva.¹⁷

Indipendentemente dallo spessore di Breslow, che può essere anche identico, un melanoma in fase di crescita verticale ha comunque un maggior potenziale metastatico rispetto ad un melanoma in fase radiale a causa del maggior volume di cellule neoplastiche. Si ritiene dunque che i melanomi con spessore inferiore ad 1mm, in fase di crescita radiale, comportino una sopravvivenza vicina al 100%. Per quanto riguarda la fase di crescita verticale, secondo alcuni autori il fenotipo cellulare mostrato dalla componente con tale fase di crescita (ad esempio cellule epitelioidi, fusiformi), potrebbe avere un valore prognostico.^{17,108,109}

Spessore di Breslow

Lo spessore di Breslow rappresenta il fattore prognostico indipendente più importante indicativo della sopravvivenza del paziente ed è il principale fattore predittivo della progressione biologica della neoplasia.^{2,6}

Tale spessore viene misurato a partire dallo strato granuloso o, quando la lesione è ulcerata, dal fondo dell'ulcerazione fino al punto di massima infiltrazione della neoplasia in profondità. È importante ricordare che il coinvolgimento di follicoli e strutture annessiali da parte di un melanoma in situ, anche se si tratta di elementi situati in profondità, non va considerato per la misurazione dello spessore di Breslow, al contrario dell'invasione perineurale. Certamente un maggiore spessore di Breslow è indicativo di una maggiore probabilità di presentare crescita verticale, di un maggior volume tumorale e correla in genere con una maggior rischio sviluppo di metastasi linfonodali.^{17,107}

L'ottava edizione del AJCC Cancer Staging Manual ha modificato la modalità di approssimazione dello spessore di 0,1 mm rispetto allo 0,01 mm (ad esempio, uno spessore da 0,75 a 0,84 mm verrebbe arrotondato a 0,8 mm). La microsatellitosi non viene normalmente inclusa in questa misurazione del tumore primitivo ma commentata separatamente. Melanomi di 0.76 mm di spessore di Breslow, correlano con una sopravvivenza del 99% a 5anni, con dato a 10 anni del 92%. Pazienti con melanomi di 1mm di spessore di Breslow, hanno un 20% di mortalità a 10 anni mentre tumori superiori a 4 mm presentano una mortalità del 50% a 10anni.^{17,108,109}

Ulcerazione

L'ulcerazione istologica del tumore primitivo è riconosciuta come una significativa variabile prognostica e tende a predire una maggiore probabilità di metastatizzazione a livello linfonodale e viscerale. Viene in genere segnalata come presente o assente. Cambiamenti istologici risultanti da una precedente biopsia diagnostica o da trauma non dovrebbe essere confuso con l'ulcerazione nel campione. L'ulcerazione viene valutata microscopicamente in base alla presenza delle seguenti caratteristiche:

- mancanza dell'epidermide a tutto spessore compreso lo strato corneo,
- evidenza di fenomeni reattivi (depositi di fibrina, neutrofili),
- iperplasia reattiva o assottigliamento dell'epidermide adiacente, in assenza di trauma in anamnesi.^{2,3,17}

L'ulcerazione è indicativa di una rapida crescita tumorale in quanto generalmente si verifica secondariamente ad ischemia relativa della massa tumorale dovuta proprio alla crescita rapida della massa. La sopravvivenza a 5anni per gli stadi I/II, passa dall'80% al 55% in presenza di ulcerazione, per lo stadio III dal 53% al 12%. Risulta utile sottolineare come la maggioranza delle neoplasie in stadio IV si presenti già ulcerata al momento della diagnosi. L'ulcerazione è quindi un parametro prognostico molto importante tanto da essere incluso anche nella stadiazione TNM.^{17,108,109}

Indice mitotico

Anche l'indice mitotico rappresenta un importante fattore prognostico. L'indice mitotico viene comunemente espresso come numero di mitosi/mm² ed è valutato nella componente invasiva del melanoma, a partire dalla zona con maggiore attività mitotica, definita “*hot spot*”, estendendo la conta ai campi adiacenti per un'area complessiva di 1 mm². Se non sono identificabili “*hot spots*” e le mitosi sono diffuse nella componente in fase di crescita verticale, si sceglie un campo con numero di mitosi rappresentativo e si estende la conta ai campi adiacenti, sempre per un'area complessiva di 1 millimetro quadrato. La conta mitotica era stata inclusa, in sostituzione del livello Clark, come attributo di staging nella settima edizione del sistema di stadiazione AJCC e la presenza anche di una singola mitosi consentiva un up-grading del tumore primitivo dallo stadio pT1a a pT1b. Nell'ottava edizione il sistema di stadiazione AJCC, l'indice mitotico del tumore come variabile dicotomica è stata rimossa dai criteri di stadiazione per T1. Tuttavia, il tasso mitotico rimane un importante fattore prognostico che dovrebbe essere riportato (come numero intero per mm²) per tutti i pazienti con melanoma da T1 a T4 perché è associato alla sopravvivenza in tutte le categorie di spessore. Infatti il riscontro all'esame istologico di una figura mitotica comporta una riduzione della sopravvivenza, che peggiora all'aumentare del numero di mitosi, anche se in maniera non lineare.^{17,108,109}

Livello di invasione di Clark

Il livello di invasione di Clark ha dimostrato di possedere un valore aggiunto da un punto di vista prognostico, soprattutto nei melanomi con spessore di Breslow < 1mm. Il livello di invasione di Clark e lo spessore di Breslow tendono generalmente a sovrapporsi, ovvero maggiore è il livello di invasione, maggiore sarà lo spessore del melanoma. Per i melanomi <1 mm, viene riportato un rischio di progressione di malattia 3.5 volte maggiore per il livello III di Clark, rispetto al livello II. Per “*microstaging*” del melanoma cutaneo si intende la misurazione, all'esame istologico dell'intera lesione, dello spessore verticale della neoplasia in millimetri o identificando il livello anatomico dell'invasione (livello di Clark). Attualmente il livello di Clark viene considerato un parametro facoltativo e non essenziale nella stadiazione patologica del melanoma; in ogni caso appare come un parametro utile soprattutto per lesioni sottili.^{17,108,109}

Infiltrato infiammatorio

La presenza di un infiltrato infiammatorio linfocitario nel contesto della neoplasia rappresenta un importante fattore prognostico. In alcuni studi la presenza di linfociti infiltranti il melanoma è risultata essere un fattore prognostico indipendente associato a prognosi favorevole, in altri invece ha perso valore di fronte all'analisi multivariata. La presenza di linfociti infiltranti la neoplasia viene classificata secondo i criteri di Elder et al. stabilendo l'estensione e la localizzazione dell'infiltrato linfocitario nella componente invasiva dermica del melanoma. L'infiltrato infiammatorio viene generalmente distinto in "brisk, non brisk e assente". L'infiltrato si definisce Brisk quando è identificabile all'interno della neoplasia, estendendosi anche a tutta la base del melanoma ed è correlato a prognosi positiva. Il non-Brisk è rappresentato da uno o più foci di infiltrato linfocitario all'interno o alla periferia del tumore. L'infiltrato viene invece considerato assente se non sono presenti linfociti. Il riscontro di plasmacellule e macrofagi come un fattore potenzialmente negativo. È inoltre emerso che l'infiltrato definito come "absent", correla più spesso con la positività del linfonodo sentinella, mentre l'infiltrato Brisk mostra percentuali minori percentuali di positività linfonodale. Pertanto, la determinazione dei TILs (Tumor Infiltrating Lymphocytes) secondo la classificazione di Elder et al., nel referto anatomopatologico, è attualmente consigliata. Altri studi recenti confermano il dato e rilevano una sopravvivenza migliore nei pazienti con infiltrato linfocitario marcato.^{17,109,110}

Regressione

La regressione istologica consiste nella presenza di fibrosi dermica, talvolta associata a proliferazione vascolare, infiltrato infiammatorio e presenza di melanofagi, con completa o parziale distruzione delle cellule neoplastiche. Può essere presente un assottigliamento dello strato epidermico sovrastante, con perdita del classico profilo delle papille dermiche. La portata del fenomeno regressivo può essere molto variabile, andando da focale ad esteso, si considera estesa la regressione che coinvolge più del 75% della componente invasiva della neoplasia.¹³²

La regressione dermica è il risultato della risposta immunologica dell'ospite verso la neoplasia, interpretabile pertanto potenzialmente come un fattore positivo; è però possibile che la presenza di estesi fenomeni di regressione possa determinare una sottostadiazione del tumore primitivo. Secondo altri Autori la regressione potrebbe dare luogo a selezione dei cloni neoplastici più aggressivi, senza riuscire a fermare completamente la progressione neoplastica.^{17,109}

I dati più recenti presenti in letteratura supportano l'idea che la regressione istologica non sia un fattore prognostico negativo per la sopravvivenza o indicativo della presenza di metastasi linfonodali. Sembra associarsi di converso ad una minore probabilità di positività al linfonodo sentinella, aumento della sopravvivenza, eccetto che nei casi di regressione estese o completa. Se è presente regressione estesa si considera il ricorso alla metodica del linfonodo sentinella anche in melanomi cutanei di spessore <1mm. È infatti stata riscontrata in questo particolare sottogruppo di pazienti una aumentata percentuale di metastasi, sia linfonodali che sistemiche. Nel caso in cui gli estesi fenomeni di regressione siano associati ad una residua componente di melanoma intraepidermico il referto anatomico-patologico dovrebbe indicare esplicitamente “Melanoma con estesi fenomeni di regressione e residua componente di melanoma in situ” poiché la terminologia “melanoma in situ con fenomeni di regressione” potrebbe essere meno suggestiva del reale potenziale biologico della lesione. ^{17,109,111}

Microsatellitosi e metastasi in transit

Nella ottava edizione del sistema stadivo AJCC non sono più utilizzati i termini “micrometastasi” o “macrometastasi” mentre si fa riferimento a malattia “clinicamente occulta” oppure “documentata clinicamente”. I satelliti sono definiti come metastasi cutanee e/o sottocutanee riconosciute clinicamente localizzate entro 2 cm dal melanoma primitivo. Le metastasi in transit sono definite come metastasi dermiche e/o sottocutanee clinicamente evidenti poste ad una distanza >2 cm dal melanoma primitivo, nella regione compresa tra la lesione primitiva e la stazione linfatica regionale drenante. La precedente edizione del sistema di stadiazione AJCC definiva la microsatellitosi come presenza di aggregati cellulari di diametro maggiore o uguale a 0,05mm, distanziati dal tumore principale da almeno 0.3 mm di tessuto normale non interessato da infiammazione o fibrosi. L'ottava edizione del sistema di stadiazione AJCC ha ampliato questa definizione, includendo qualsiasi microscopico deposito adiacente o posto in profondità rispetto al melanoma primitivo, indipendentemente dalle dimensioni o dalla distanza dal tumore principale. ^{17,109}

Nell'ottava edizione del sistema di stadiazione AJCC, la presenza di metastasi in transit, satellite e/o microsatelliti viene classificata come N1c (stadio patologico IIIB con un primario da T1a/b a T3a del tumore primitivo e stadio patologico IIIC con un T3b o T4a/b del tumore primitivo) in assenza di linfonodi loco regionali coinvolti LN (s) e N2c o N3c in base alla presenza di 1 (N2c) o 2 o più (N3c) linfonodi loco regionali coinvolti contemporaneamente. A seconda dello specifico T- e dei criteri di categoria N, tali pazienti vengono classificati come stadio IIIC o IIID.

Nella stadiazione TNM la presenza quindi sia di microsattellitosi, che di satellitosi o metastasi in transit, determina un incremento di stadio della malattia. La presenza o l'assenza di microsattelliti in particolare deve essere scrupolosamente ricercata e segnalata al fine di ottenere una corretta stadiazione.^{17,109,112}

Invasione linfovaskolare

L'invasione linfovaskolare rappresenta un ulteriore fattore prognostico negativo, determinando un aumentato rischio interessamento linfonodale e recidiva tumorale. L'invasione vascolare comporta una riduzione di sopravvivenza: se riscontrata nel tumore primitivo in fase di crescita verticale secondo alcune analisi multivariate sembrerebbe avere un valore prognostico simile a quello dell'ulcerazione.^{17,109,112}

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

L'interessamento delle stazioni linfonodali nel melanoma cutaneo rappresenta un fenomeno che assume significato prognostico negativo conferendo alla neoplasia un aumentato rischio di recidiva, con conseguente ripercussione sulla sopravvivenza globale del paziente. Identificare precocemente l'eventuale presenza di metastasi consente di stabilire l'approccio chirurgico più corretto, di stabilire il follow up più adatto al paziente e di valutare le opzioni terapeutiche a disposizione anche in previsione del loro impiego come terapia adiuvante. Una meta-analisi comprendente 71 trial clinici e 25.240 partecipanti ha stimato un rischio complessivo del 5% o inferiore di recidiva linfonodale regionale a seguito di esito negativo della procedura di ricerca del linfonodo sentinella. Recentemente, la sopravvivenza è stata notevolmente migliorata con l'uso degli inibitori del checkpoint immunitario e delle terapie target della MAPK pathway. Questi agenti hanno recentemente mostrato un vantaggio in termini di sopravvivenza nel contesto adiuvante per i pazienti con linfonodo sentinella positivo.^{17,109}

Altri fattori prognostici: sesso, età, sede anatomica

- **Sesso:** il sesso femminile si associa in genere ad una prognosi migliore, anche se risultati contrastanti sono presenti a riguardo. La migliore prognosi nel sesso femminile sembrerebbe infatti riconducibile al fatto che le donne sono più frequentemente affette da melanoma sottile dell'arto inferiore che si caratterizza di per sé per una prognosi

migliore¹³¹⁻¹³⁴ Uno studio recentemente condotto su 10.538 donne che ha considerato la localizzazione anatomica, lo spessore di Breslow, l'istotipo, l'età, l'interessamento linfonodale o la presenza di malattia sistemica, ha confermato che il sesso è un fattore prognostico indipendente nella storia del melanoma cutaneo.^{2,17,113}

- **Età:** pazienti aventi un'età superiore ai 60 anni presentano in genere una prognosi peggiore.^{2,17,113}

L'età risulta essere un fattore prognostico indipendente e che i melanomi che si manifestano prima dei 20 anni e dopo i 70 anni sembrano avere anche caratteristiche biologiche differenti. Prima dei 20 anni di età i melanomi tendono a presentare caratteristiche istologiche di aggressività, con una maggiore frequenza di sviluppo di metastasi linfonodali, ma con una sopravvivenza migliore. In età avanzata, c'è una maggiore prevalenza di lesioni della testa e del collo, con un numero maggiore di melanomi di tipo desmoplastico o acrali-lentiginosi ed una diminuzione delle lesioni al tronco. Parimenti lo spessore di Breslow e la conta mitotica tendono ad aumentare ed in generale si assiste ad un peggioramento globale di tutti i fattori prognostici istologici e della prognosi. Anche il profilo molecolare dei melanomi varia al mutare dell'età: nei bambini si assiste più spesso alla perdita di INK4A e a mutazioni di KIT, mentre nei giovani sono più comuni melanomi BRAF mutati. Questo dato, assieme all'evidenza di un diverso status immunologico, potrebbe spiegare la differenza di prognosi età-correlata, pur essendo difficile a volte escludere che le comorbidità dei pazienti più anziani non contribuiscano, almeno in parte, alla loro peggiore prognosi.^{2,17,113}

- **Sede anatomica:** la sede anatomica del melanoma primario sembra rivestire un importante valore prognostico; melanomi cutanei delle zone centrali (tronco, testa e collo) tendono ad avere prognosi peggiore, rispetto a quelli che originano in altri distretti anche in relazione alla difficoltà di esecuzione e di interpretazione della ricerca del linfonodo sentinella.^{2,17,113}

Marcatore sierici e molecolari

- **Livelli di LDH sierico:** la concentrazione sierica di LDH è stata inserita nel 2002 nella classificazione AJCC (sesta edizione) nell'ambito della definizione dello stadio IV di patologia. Nell'ottava edizione del sistema di stadiazione AJCC il parametro LDH è stato inserito per la definizione della sottocategoria M del TNM. Nei pazienti con metastasi a distanza, il riscontro di elevati livelli di LDH è predittivo di riduzione della

sopravvivenza (del 50% rispetto a pazienti con livelli normali di LDH e di ridotta risposta a terapia antineoplastica. Il dosaggio del livello sierico di LDH non è raccomandato al basale o per la sorveglianza in pazienti con stadi inferiori della malattia (stadio I-III), data la mancanza di sensibilità o specificità per il rilevamento di metastasi, trattandosi di un marker sierologico piuttosto aspecifico.^{17,109,114-117}

- **Livelli sierici di proteina S100-beta (S100B):** Il suo utilizzo è stato valutato in molteplici studi europei, che suggeriscono il suo ruolo come potenziale biomarcatore prognostico in pazienti affetti da melanoma come strumento utile per identificare progressione della malattia. Una meta-analisi del 2008 di 22 studi che hanno coinvolto 3393 pazienti con melanoma stadio da I a IV ha dimostrato una sopravvivenza peggiore nei pazienti con livelli sierici di S100B. Uno studio condotto su 876 pazienti in stadio clinico I non ha rivelato alcuna correlazione significativa tra livelli di S100B e sopravvivenza, e la maggior parte dei dati suggeriscono un potenziale valore prognostico o uso come marker terapeutico in pazienti con malattia in stadio III e IV. Il test sierico S100B non è un test di routine e non è consigliato al basale o per la sorveglianza di pazienti asintomatici sulla base delle attuali evidenze. Si tratta comunque di un marker utile in fase di malattia localmente avanzata o sistemica, mentre in caso di malattia ancora localizzata (stadio I-II) non sembra rilevarsi di alcuna utilità.^{17,109,116,117}
- **Livelli sierici di proteina C reattiva (PCR):** Elevati livelli di PCR sono correlati ad una prognosi peggiore in numerosi tumori solidi. Nel melanoma il valore di PCR come biomarcatore negativo sembrerebbe maggiore nel paziente con patologia metastatica e più affidabile rispetto al valore dell'LDH, con un cut-off di 3mg/l. Si tratta però di un marker della risposta di fase acuta del processo infiammatorio i cui valori di sensibilità e specificità risultano ancora oggi oggetto di discussione.^{17,109,116,117}
- **Mutazioni genetiche:** il riscontro di positività alla mutazione di BRAF in presenza di malattia diffusa ai linfonodi loco regionali rappresenta un fattore prognostico negativo. La presenza di mutazioni NRAS correla con una minor sopravvivenza nel paziente metastatico. I pazienti con mutazioni in BRAF ed NRAS metastatici risultano avere una maggior probabilità, rispetto agli *wild-type*, di sviluppare metastasi a livello del sistema nervoso centrale.^{118,119}

Sono state recentemente identificate nuove molecole coinvolte nei processi di metastatizzazione e angiogenesi, potenzialmente impiegabili come fattori prognostici in molteplici neoplasie incluso il melanoma cutaneo. Tra queste si annoverano:

- **Galectina-3:** La galectina-3 è una molecola che sembra correlare con una prognosi peggiore nel carcinoma epatocellulare, essendo responsabile apparentemente di una maggiore vascolarizzazione della lesione neoplastica primitiva.¹⁵⁴ Si tratta di una proteina multifunzionale, che fa parte della famiglia delle lectine leganti il α -galattoside. E' coinvolta nei processi di differenziazione cellulare, nella proliferazione, nella neo-angiogenesi, nell'invasione tumorale e nel processo di metastatizzazione. Nel melanoma è stata identificata come fattore prognostico indipendente nel 2009 ed è risultata un utile fattore nel predire la sopravvivenza dei pazienti con tumori in fase avanzata (stadio III/IV) con un cut-off dei livelli sierici di 10ng/ml dove livelli superiori risultavano correlati a prognosi negativa.^{120,121}

Nel paziente con melanoma la galectina-3 risulta incrementata nel siero sia perché prodotta dalle cellule neoplastiche sia perché prodotta dalle cellule infiammatorie.¹⁵¹ Recenti studi sembrano confermare l'importante ruolo nella fase metastatica di questa molecola, la cui presenza nel melanoma primitivo (rilevabile nel preparato istologico) sembra essere utilizzabile per predire la prognosi del paziente, ma si attendono ulteriori dati su casistiche più estese per confermare tale dato.¹²²

- **miRNA:** Il miRNA-21 sembra correlare con lo spessore di Breslow e con la presenza di ulcerazione nel melanoma primitivo. Risulta dosabile tramite prelievo ematico ed i suoi livelli si riducono e negativizzano dopo asportazione chirurgica. Sarebbe pertanto essere impiegabile nel follow-up del paziente neoplastico, anche se sono necessari ulteriori studi su più ampie casistiche per confermare i dati preliminari. Rappresenta dunque un promettente fattore prognostico per il paziente avanzato ed attualmente la ricerca si sta focalizzando sulla caratterizzazione dei profili di espressione contemporanea di multipli miRNA.¹²³

La ricerca si è anche focalizzata su marker immunoistochimici espressi nel tumore primitivo tra cui l'EIF5A2 (Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A-2) e PHIP (Pleckstrin Homology domain Interacting Protein), entrambi coinvolti nella via di trasduzione del segnale PI3K.¹²⁴⁻¹²⁶

DIAGNOSI

Nella comune pratica clinica la visita dermatologica dovrebbe comprendere sia la valutazione ad occhio nudo delle lesioni in presenza di adeguata illuminazione sia la loro osservazione mediante dermatoscopia condotta da personale medico qualificato.^{17,109}

La diagnosi clinica di melanoma è generalmente difficoltosa ed è condizionata direttamente dall'esperienza del clinico con sensibilità in genere compresa tra il 50 e l'85%. I fattori ispettivi da considerare prima di procedere all'eventuale rimozione chirurgica della lesione si basano sui criteri previsti dal sistema ABCDE per le lesioni piane e EFG per le lesioni nodulari. È stato inoltre dimostrato che i pazienti correttamente istruiti sul valore dell'auto-ispezione cutanea (*skin self-examination*) presentano mediamente lesioni meno avanzate con conseguente prognosi migliore.¹⁶² Infatti negli ultimi anni è stato riscontrato un aumento del numero delle lesioni diagnosticate nello stadio iniziale "in situ" con sensibile miglioramento della prognosi.¹²⁷

Ma a modificare radicalmente l'approccio alla diagnosi precoce delle lesioni melanocitarie ha concorso la dermatoscopia, consentendo innanzitutto di identificare le lesioni melanocitarie e poi di confermare l'eventuale sospetto di malignità all'osservazione clinica, riducendo il numero di asportazioni chirurgiche non necessarie. Mediante l'utilizzo di questa metodica, di facile impiego clinico, la diagnosi clinica raggiunge sensibilità e specificità del 90%, con valori superiori se ad effettuarla è uno specialista con almeno 5 anni di esperienza clinica.

La dermatoscopia rappresenta una tecnica in vivo, non invasiva, che permette di valutare a maggiore ingrandimento la neoformazione, consentendo una migliore caratterizzazione di elementi architettonici non apprezzabili ad occhio nudo. L'architettura della lesione infatti appare più nitida ed è possibile analizzare il pattern della vascolarizzazione e della distribuzione del pigmento. Questa tecnica consente una migliore interpretazione diagnostica delle lesioni melanomatose sottili, dei nevi melanocitici e delle lesioni non melanocitarie agevolando la diagnosi differenziale dei carcinomi cutanei, cheratosi seborroiche, dermatofibromi, angiomi ed angiocheratomi. Il primo orientamento nel corso dell'esame dermoscopico è legato alla valutazione del colore, del grado di pigmentazione e della sua relativa distribuzione nell'ambito della lesione. La melanina rappresenta il pigmento più importante nel determinare differenti pattern strutturali e cromatici. A seconda della localizzazione del pigmento melanico nei vari strati cutanei la lesione assume una colorazione differente: nero per pigmento presente nello strato corneo-spinoso, marrone con varie gradazioni in rapporto alla quantità di pigmento presente per localizzazione giunzionale, blu con varie gradazioni a partire dal derma papillare, fino al reticolare. Altri colori visualizzati durante l'esame dermoscopico sono le tonalità del

bianco, indicative di regressione, e del rosso, correlate alla vascolarizzazione. Nei nevi melanocitici il pigmento appare omogeneo, a limiti sfumati e più addensato al centro della lesione. Nel melanoma, e talora anche nei nevi in regressione, le aree di pigmentazione sono più disomogenee, asimmetriche, irregolari, localizzate a volte alla periferia della lesione con la presenza di numerose tonalità di colore (più di tre colori). La marcata disomogeneità e le interruzioni improvvise del disegno pigmentario in periferia possono rappresentare un criterio importante per la diagnosi di melanoma. In aggiunta, possono essere messe in evidenza anche caratteristiche microstrutturali e vascolari, che possiedono numerose modalità di presentazione.³⁴ A causa dell'elevato numero di caratteristiche da prendere in considerazione, la diagnosi in dermatoscopia si avvale di algoritmi tra cui la pattern analysis, l'ABCD di Stolz, il metodo di Menzies e la Seven-point check list risultano essere fondamentali. La dermatoscopia manuale rimane l'approccio più diffuso ma l'esame dermoscopic può essere effettuato anche mediante videodermatoscopio (o dermatoscopio digitale). Il videodermatoscopio è generalmente costituito da una sonda, al cui interno è posta una telecamera ad alta risoluzione, collegata ad un computer con possibilità di immagazzinare le immagini ed utilizzarle nel follow-up longitudinale del paziente. La videodermatoscopia risulta di maggiore utilità nei pazienti con la sindrome del nevo displastico o presentanti un numero elevato di nevi (>100). In questi casi la semplice dermatoscopia manuale risulta insufficiente, la mappatura dell'intera superficie corporea, con follow-up delle lesioni sospette risulta invece essere di maggiore ausilio per il controllo del paziente.^{17,128,129}

La Total Body Photography (TBP) è utilizzata proprio a tale scopo, al fine di creare un archivio completo fotografico della superficie cutanea del paziente per la valutazione di nuove lesioni o l'identificazione dei cambiamenti e dell'evoluzione di una lesione pre-esistente. Questa applicazione multimodale dovrebbe essere associata alla dermatoscopia digitale sequenziale e limitata a pazienti ad alto rischio di melanoma con numerosi nevi melanocitici.^{128,129}

Risultano oggi applicabili altre tecniche diagnostiche tra cui si menzionano il microscopio confocale a scansione laser, la tomografia a coerenza ottica, l'ecografia ad alta risoluzione e la bioimpedenza. Il microscopio confocale a scansione laser è uno strumento che fornisce immagini in vivo, in maniera non invasiva ed in tempo reale della lesione, dando una rappresentazione per piani paralleli orizzontali, situati a variabile profondità, con risoluzione equivalente a quella della microscopia classica. Questo consente di avere immagini delle singole cellule, dettagli dell'architettura dell'epidermide e del derma, con criteri interpretativi molto simili a quelli istologici, senza il bisogno di effettuare la biopsia escissionale cutanea. Il vantaggio di questa tecnica risiede in una più alta sensibilità rispetto alla dermatoscopia convenzionale ma con

specificità simile. La tomografia a coerenza ottica (OCT) è una tecnica non invasiva che si basa per costruire l'immagine, la diversa riflessione della luce da parte di strutture differenti come melanina e membrane cellulari. Questa metodica risulta in grado di analizzare l'architettura delle lesioni e dei tessuti fino ad 1mm di profondità, senza poter dare però informazioni sulla morfologia cellulare. La metodica non è ancora stata applicata a casistiche sufficientemente ampie in modo da ottenere dati sulla sua sensibilità e specificità, in modo da chiarire il suo possibile ruolo nei percorsi diagnostici.¹³⁰

L'ecografia ad alta risoluzione è una tecnica non invasiva che sfrutta ultrasuoni ad alta frequenza, consentendo una migliore risoluzione in lesioni di piccole dimensioni e superficiali. L'ecografia può essere utilizzata principalmente per chiarire la profondità e lo spessore del melanoma o per la diagnosi differenziale, con alta sensibilità e buona specificità, tra carcinoma basocellulare e melanoma. Grazie alla sua precisa caratterizzazione dello spessore del melanoma può essere d'aiuto in fase pre-operatoria. Come nell'ecografia tradizionale si può associare l'utilizzo del doppler ed anche del mezzo di contrasto ecografico, in modo da meglio definire la vascolarizzazione della neoplasia, fattore correla in genere con la sua aggressività.¹³¹

ESCISSIONE DELLA LESIONE PRIMITIVA

In presenza di una lesione cutanea compatibile clinicamente e dermatoscopicamente con una diagnosi di melanoma risulta indicata l'esecuzione della biopsia escissionale. Si raccomanda in caso di sospetto melanoma di evitare biopsie incisionali, con scarificazione o *shaving*, per la possibilità di disseminazione metastatica a seguito del trauma chirurgico. Si procede invece all'asportazione completa della lesione, in genere con una procedura semplice, attuabile in anestesia locale ed in regime ambulatoriale, lasciando 1-3 mm di margine di tessuto sano circostante. L'asportazione deve includere il grasso sottocutaneo fino alla fascia muscolare sottostante.^{17,109}

La scelta delle linee di incisione dell'escissione primaria deve tener conto della possibilità di un successivo intervento di allargamento e dell'eventuale procedura del linfonodo sentinella. Effettuare in prima battuta una biopsia escissionale con margini più ampi di quelli raccomandati potrebbe compromettere lo studio del drenaggio linfatico mediante tecnica del linfonodo sentinella.¹⁰⁹

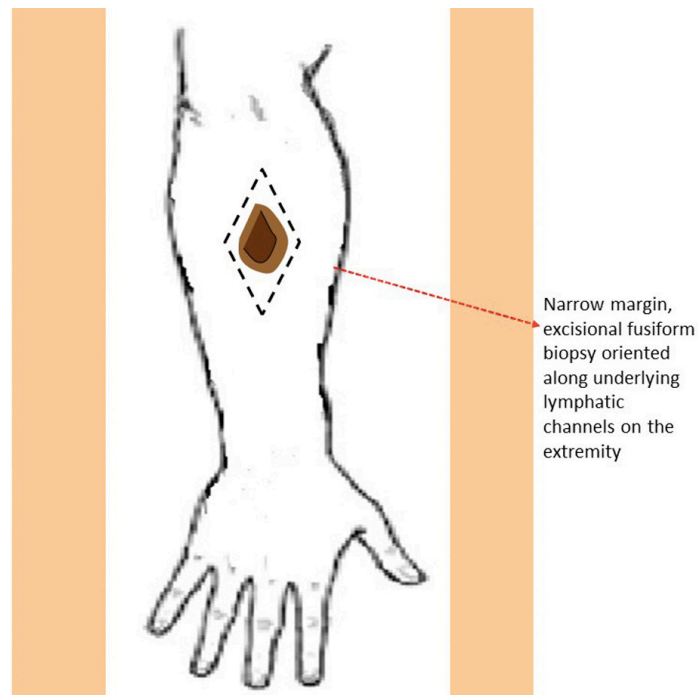


Figura 8. Asse di orientamento della biopsia escissionale del tumore primitivo

La biopsia escissionale permette di effettuare una corretta diagnosi anatomopatologica, correlata a microstadiazione e a tutti i fattori prognostici istologici, necessari per pianificare la corretta gestione stadiativa e terapeutica del paziente. Nel caso in cui la biopsia escissionale si associ ad una compromissione e demolizione importante dei tessuti in relazione alla sede (volto, orecchio, estremità) o alle dimensioni della lesione (lentigo maligna, lentigo maligna melanoma) può essere proposta una biopsia incisionale della zona pigmentata o della componente nodulare della lesione. Se la biopsia di questi dovesse rivelarsi non diagnostica è fortemente raccomandata la sua ripetizione; è stato dimostrato che questo tipo di approccio, se effettuato correttamente non inficia la prognosi del paziente.^{17,109}

STADIAZIONE

La stadiazione clinica e strumentale è finalizzata a valutare l'eventuale diffusione a livello loco-regionale della malattia, o la presenza di metastasi a distanza. La stadiazione del melanoma cutaneo oggi universalmente riconosciuta ed impiegata nella pratica clinica, è quella proposta dall'AJCC nella ottava edizione del 2018, che si basa sul sistema TNM (Tumor, Node and Metastasis).^{17,109,132}

Un'accurata stadiazione risulta fondamentale per stabilire la prognosi e conseguentemente la sopravvivenza associata ad ogni stadio, per poter quindi instaurare il trattamento idoneo al caso.

AJCC Melanoma of the Skin Staging 8th Edition

Definitions

Primary Tumor (T)

- TX** Primary tumor cannot be assessed (for example, curettaged or severely regressed melanoma)
- T0** No evidence of primary tumor
- Tis** Melanoma in situ
- T1** Melanomas 1.0 mm or less in thickness
- T2** Melanomas 1.1 - 2.0 mm
- T3** Melanomas 2.1 - 4.0 mm
- T4** Melanomas more than 4.0 mm

NOTE: a and b subcategories of T are assigned based on ulceration and thickness as shown below:

T CLASSIFICATION	THICKNESS (mm)	ULCERATION STATUS
T1	≤1.0	a: Breslow < 0.8 mm w/o ulceration b: Breslow 0.8-1.0 mm w/o ulceration or ≤ 1.0 mm w/ ulceration.
T2	1.1-2.0	a: w/o ulceration b: w/ ulceration
T3	2.1-4.0	a: w/o ulceration b: w/ ulceration
T4	>4.0	a: w/o ulceration b: w/ ulceration

Regional Lymph Nodes (N)

- NX** Patients in whom the regional nodes cannot be assessed (for example previously removed for another reason)
- N0** No regional metastases detected
- N1-3** Regional metastases based on the number of metastatic nodes, number of palpable metastatic nodes on clinical exam, and presence or absence of MSI²

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

N CLASSIFICATION	# NODES	CLINICAL DETECTABILITY/MSI STATUS
N1	0-1 node	a: clinically occult ¹ , no MSI ² b: clinically detected ¹ , no MSI ² c: 0 nodes, MSI present ²
N2	1-3 nodes	a: 2-3 nodes clinically occult ¹ , no MSI ² b: 2-3 nodes clinically detected ¹ , no MSI ² c: 1 node clinical or occult ¹ , MSI present ²
N3	>1 nodes	a: >3 nodes, all clinically occult ¹ , no MSI ² b: >3 nodes, ≥1 clinically detected ¹ or matted, no MSI ² c: >1 nodes clinical or occult ¹ , MSI present ²

Distant Metastasis (M)

- M0** No detectable evidence of distant metastases
- M1a** Metastases to skin, sub cutaneous, or distant lymph nodes
- M1b** Metastases to lung
- M1c** Metastases to all other visceral sites
- M1d** Metastases to brain

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

M CLASSIFICATION	SITE	Serum LDH
M1a-d	Skin/subcutaneous/nodule (a), lung (b) other visceral (c), brain (d)	Not assessed
M1a-d(0)	Skin/subcutaneous/nodule (a), lung (b) other visceral (c), brain (d)	Normal
M1a-d(1)	Skin/subcutaneous/nodule (a), lung (b) other visceral (c), brain (d)	Elevated

ANATOMIC STAGE/PROGNOSTIC GROUPS									
Clinical Staging ¹				Pathologic Staging					
Stage 0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0		
Stage IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0		
Stage IB	T1b	--	--	IB	T1b	--	--		
	T2a	--	--		T2a	--	--		
Stage IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	M0	M0		
	T3a	--	--		T2a	--	--		
Stage IIB	T3b	--	--	IIB	T3b	--	--		
	T4a	--	--		T4a	--	--		
Stage IIC	T4b	--	--	IIC	T4b	--	--		
Stage III	Any T	≥N1	M0	IIIA	T1-2a	N1a	M0		
	--	--	--		T1-2a	N2a	--		
	--	--	--	IIIB	T0	N1b-c	M0		
	--	--	--		T1-2a	N1b-c	--		
	--	--	--		T1-2a	N2b	--		
	--	--	--		T2b-3a	N1a-2b	--		
	--	--	--	IIC	T0	N2b-c	M0		
	--	--	--		T0	N3b-c	--		
	--	--	--		T1a-3a	N2c-3c	--		
	--	--	--		T3b-4a	Any N	--		
	--	--	--		T4b	N1a-2c	--		
	--	--	--	IIID	T4b	N3a-c	M0		
Stage IV	Any N	Any N	M1	IV	Any T	Any N	M1		

Notes

- ¹ Nodes are designated as 'clinically detectable' if they can be palpated on physical exam and are confirmed melanoma by pathology following excision/biopsy.
- ² MSI comprise any satellite, locally recurrent, or in transit lesions.
- ³ Clinical staging includes microstaging of the primary melanoma and clinical/radiologic evaluation for metastases. By convention it should be used after complete excision of the primary melanoma with clinical assessment for regional and distant metastases.
- ⁴ Pathologic staging includes microstaging of the primary melanoma and pathologic information about the regional lymph nodes after partial or complete lymphadenectomy.

Produced following the 8th Ed. AJCC guidelines released January 1, 2017. Contact Dr. M. Gormally (mvgg07@gmail.com) for reprint. Version 1.4

Figure 9. Melanoma of the Skin Staging - American Joint Committee on Cancer /8th Edition 2018

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

Figure 10. Stadiazione e Sopravvivenza correlata a 5 e 10 anni dalla diagnosi del tumore primitivo

I criteri per la stadiazione includono lo stato del *microstaging* della lesione primaria ed i fattori prognostici istologici principali come spessore ed ulcerazione che condizionano la stadio della patologia. Lo studio del coinvolgimento dei linfonodi loco regionali è altrettanto necessario ed è eseguibile mediante linfonodo sentinella e con linfadenectomia parziale o completa. La stadiazione può essere clinica e/o patologica. La prima comprende necessariamente la microstadiazione del tumore primitivo, asportato completamente, e la valutazione clinico-radiologica del paziente. Può essere applicata quindi solo dopo escissione completa del tumore primitivo. La stadiazione patologica comprende la microstadiazione del melanoma primitivo, e le informazioni anatomo-patologiche riguardanti lo status dei linfonodi regionali, dopo linfadenectomia parziale (tecnica del linfonodo sentinella) o completa; per gli stadi 0 ed IA, non è richiesta valutazione anatomo-patologica dei linfonodi. Non esiste ancora un consenso unanime sulle indicazioni all'applicazione delle diverse modalità diagnostiche per la stadiazione. Oggi il 50-70% dei melanomi è diagnosticato in fase precoce, con rischio di recidiva e diffusione inesistente per il melanoma in situ e molto basso per il melanoma in stadio IA. È importante quindi identificare quali siano le indagini più appropriate per questa tipologia di pazienti, evitando *l'overtreatment*. È infatti fondamentale modulare la scelta degli esami in funzione del rischio del paziente. Tra le metodiche attualmente impiegate l'ecografia appare la migliore nel rilevare le metastasi linfonodali mentre la PET-TC è risultata essere superiore alle altre metodiche nel rilevare la presenza di eventuali metastasi a distanza, con alta sensibilità ma bassa specificità. Questo comporta un alto numero di falsi positivi, per cui il suo uso non è indicato in pazienti a basso rischio, a meno che non siano presenti indicazioni cliniche precise. L'utilizzo di metodiche come la TAC encefalo-torace-addome o la PET-TC pertanto, è giustificato solo in caso di pazienti ad elevato rischio, ad esempio con tumore primitivo di elevato spessore (T4), con ulcerazione o con indice mitotico $>1\text{mm}^2$ (T4b), oppure nel paziente con metastasi linfonodale evidente (stadio III). Sempre nel paziente ad alto rischio e/o metastatico (stadio IV), è possibile il dosaggio del LDH, in quanto consente di stratificare il rischio di exitus. Per quanto riguarda il paziente a rischio intermedio, con tumore primitivo T2-T4a senza evidenza clinica di metastasi linfonodali, viene raccomandata l'esecuzione della radiografia standard del torace ed ecografia addome, ma la preferenza per queste indagini non è ancora unanime. Nel paziente a basso rischio (stadio IA) alcuni autori depongono a favore del solo esame clinico nel paziente asintomatico, altri ricorrono comunque allo studio ecografico dei bacini di drenaggio linfatico in quanto poco costoso, tollerato e ripetibile. Nel paziente con melanoma in situ, non deve essere eseguito nessun esame di stadiazione, ma è necessaria un'accurata visita dermatologica, al fine di escludere l'insorgenza di nuove lesioni neoplastiche.^{17,109,132}

TERAPIA e FOLLOW-UP

Dopo la biopsia escissionale, il cui ruolo principale è quello di confermare la diagnosi e fornire i fattori prognostici istologici del tumore primitivo, il trattamento chirurgico consiste nell'ampliamento dei margini di resezione. L'allargamento chirurgico ha lo scopo di ridurre significativamente il rischio di recidiva locale di malattia. Il margine sano che deve essere ottenuto è variabile a seconda dello spessore di Breslow della lesione, parametro che oltre a correlare con la sopravvivenza, correla anche con il rischio di recidiva locale.^{17,109,132}

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

- Melanoma in situ: 5 mm
- Melanoma \leq 2mm di spessore: 1 cm
- Melanoma $>$ 2mm di spessore: 2 cm.^{17,109}

L'escissione deve raggiungere la fascia muscolare che viene conservata. Il pezzo operatorio, comprendente la cicatrice del precedente intervento, la cute ed il sottocute, deve essere orientato, ed inviato in anatomia patologica. Nella maggior parte dei casi è possibile chiudere la ferita attraverso un accostamento dei margini di escissione, mentre in altri è necessario adottare dei semplici lembi cutanei. In sedi particolari può essere necessario il ricorso ad innesti.^{109,132}

Nei casi di lentigo maligna, lesione spesso a margini sfumati, possono essere necessarie asportazioni più ampie o tecniche di valutazione intraoperatoria dei margini, per poter raggiungere una corretta exeresi.¹⁷

Poiché la valutazione intraoperatoria dei margini non viene rutinariamente impiegata, una recente survey proposta dall'Associazione Europea dei Dermatologi e Venereologi (EADV) ha evidenziato che l'opzione terapeutica di prima scelta nel trattamento della lentigo maligna è quella chirurgica (97.6%) seguita dall'applicazione topica di imiquimod (49.7%), radioterapia (26.9%) ed infine dalla crioterapia (25.2%).^{17,109}

Nei melanomi del letto ungueale, o della parte distale delle dita, può essere necessario procedere alla disarticolazione dell'ultima falange, o dell'articolazione metacarpo-falangea.¹⁷

Tecnica del linfonodo sentinella

La tecnica del linfonodo sentinella è una procedura considerata minimamente invasiva, che permette di valutare lo status linfonodale e di individuare i pazienti con linfonodi metastatici, clinicamente non palpabili, candidati a dissezione linfonodale completa.¹⁷

Nonostante oggi la maggior parte delle diagnosi di melanoma avvenga in pazienti con malattia localizzata, una percentuale significativa di questi tra il 15 e il 20% di questi pazienti al momento della diagnosi ha già sviluppato micrometastasi interessanti le stazioni linfatiche regionali, che daranno luogo allo sviluppo di metastasi linfonodali evidenti nella maggioranza dei casi, con un peggioramento della prognosi.^{17,132}

In caso di un singolo linfonodo metastatico la sopravvivenza a 10 anni risulta essere infatti ridotta del 50%.¹⁷

La tecnica del linfonodo sentinella è stata introdotta nel 1992 da Morton, per consentire di identificare la presenza di micrometastasi linfonodali. Permette infatti di identificare i pazienti in stadio III occulto al momento della diagnosi, consentendo di applicare terapie chirurgiche più aggressive, come la dissezione linfonodale completa e terapie oncologiche sistemiche, solo in questo subset di pazienti, con l'obiettivo di migliorarne la sopravvivenza. La prima sede della eventuale recidiva di malattia, dopo escissione del melanoma primitivo, è solitamente il bacino linfatico di drenaggio. Con la semplice osservazione clinica/ecografica del paziente dopo escissione del primitivo (*nodal observation*), il tasso di recidiva linfonodale si attesta al 15-50% ed il tasso di metastatizzazione sistemica al 50%. Proponendo la dissezione linfatica elettiva in tutti i pazienti, si avrebbe solo un 15-20% di casi in cui potrebbe essere realmente vantaggiosa, con una maggiore morbilità per i pazienti. Studi prospettici randomizzati non hanno inoltre rilevato un aumento della sopravvivenza in pazienti in stadio I e II con tale approccio. L'esecuzione del linfonodo sentinella, per la determinazione dell'interessamento linfonodale precoce, appare dunque la scelta più razionale.^{17,109,132}

L'applicazione della dissezione nodale completa viene intrapresa ad oggi, solo in occasione di una positività riscontrata a carico del linfonodo sentinella; anche se recenti lavori di letteratura si stanno interrogando sul vero impatto della metodica sulla sopravvivenza dei pazienti.¹³³

La metodica si basa sul concetto che il drenaggio linfatico dalla cute ai linfonodi regionali avviene in maniera ordinata, e che il primo linfonodo ricevente il drenaggio linfatico dalla zona di insorgenza del tumore è quello con la maggiore probabilità di essere interessato per primo dal processo di metastatizzazione. La ricerca del linfonodo sentinella viene effettuata con la metodica combinata, che prevede l'iniezione di colorante blu vitale e radio-colloide (tracciante

radiomarcato) nel sito della lesione primaria e l'esecuzione di una linfoscintigrafia dinamica, che consente di individuare la zona di drenaggio ed il linfonodo. In sede operatoria l'utilizzo di una gamma camera che emette un segnale acustico, guida il chirurgo nella ricerca e nel prelievo del linfonodo coinvolto. Con tale tecnica il linfonodo viene individuato nel 99% dei casi, con tuttavia una riduzione della sensibilità diagnostica nei melanomi del distretto testa-collo. Grazie alla scintigrafia inoltre è possibile, nel 10% dei casi circa, identificare anche altri linfonodi di drenaggio in sedi insolite, aggiuntive, rispetto a quelli situate nelle tre zone più comuni (ascella, inguine, collo). Questi linfonodi vengono prelevati ed analizzati, in quanto sono da considerare comunque linfonodi sentinella a tutti gli effetti. La loro percentuale di interessamento da parte di micrometastasi infatti è del tutto simile a quella dei linfonodi situati in sedi classiche. La loro mancata presa in considerazione porterebbe ad una possibile sottostadiazione della malattia, con compromissione del risultato terapeutico. Oggi risulta inoltre possibile applicare la metodica SPECT-TC (Single Photon Emission Computed Tomography-TC) che consente, tramite tecnica "ibrida", di avere immagini ancora più dettagliate e precise, di regioni anatomicamente difficili come la testa o il collo, o di linfonodi situati molto vicino alle sedi primitive.^{17,109,132,133}

L'applicazione della metodica del linfonodo sentinella, con queste premesse, consente di predire lo stato dei linfonodi regionali con oltre il 95% di accuratezza, percentuale del tutto simile a ciò che si avrebbe con la dissezione linfonodale completa in elezione, che comporta però più complicanze.^{17,133}

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

- 1- mancata rilevazione/prelievo di un linfonodo sentinella (nel caso di più linfonodi marcati, vanno comunque tutti asportati),
- 2- la metodica è stata correttamente applicata, ma al momento c'erano delle metastasi microscopiche in-transit non ancora arrivate al sito di drenaggio regionale,
- 3- il linfonodo è stato correttamente asportato, ma il suo interessamento non è stato rivelato per l'esiguo numero di cellule neoplastiche presenti, o per la presenza di micro metastasi in un punto del linfonodo non analizzato dal patologo.^{17,133}

Le attuali indicazioni per l'analisi anatomo-patologica delle sezioni del linfonodo sentinella raccomandano l'uso, oltre che di sezioni all'ematossilina-eosina, di metodi immuno-istochimici che utilizzano ad esempio anticorpi anti-MART1, HMB45, e S-100, per incrementare le possibilità di identificazione di eventuali cellule neoplastiche. Non esiste tuttavia un protocollo standardizzato che stabilisca il numero minimo di sezioni istologiche o i marcatori immuno-

istochimici da impiegare. Attualmente si raccomanda l'utilizzo del protocollo di campionamento estensivo dell'EORTC Melanoma Group.^{17,109,132}

La percentuale di complicanze locali della metodica risulta contenuta e si manifesta nel 10% dei casi in forma di linfedema, linfocele, axillary web syndrome, parestesie/anestesia dovute a lesioni nervose durante la metodica, linfangite. È doveroso sottolineare che molte di queste complicazioni manifestano transitorietà.¹³³

Recenti studi hanno dimostrato come la biopsia del linfonodo sentinella sia capace di incrementare la sopravvivenza libera da malattia, specie nei pazienti con spessore del melanoma compreso tra 1.2 e 3.5mm definiti pazienti a rischio intermedio (71.2% di sopravvivenza libera da malattia a 10 anni contro 64.7% nei pazienti in cui non si esegue la tecnica).¹³³

Tra i pazienti con metastasi linfonodali si evidenziano differenze statisticamente significative di sopravvivenza, infatti i pazienti con linfonodo sentinella positivo sottoposti a precoce linfadenectomia loco regionale, mostrano una sopravvivenza a 10 anni del 62.1%, rispetto al 41.5% di quelli sottoposti a linfadenectomia differita, eseguita comunque solo in seguito a riscontro clinico di metastasi linfonodali durante il follow-up clinico/strumentale. Questo a dimostrazione dell'esistenza di un vantaggio di sopravvivenza correlato alla metodica in questi pazienti.¹⁷

Il valore prognostico del linfonodo sentinella è stato chiaramente dimostrato: nei pazienti con melanomi di spessore compreso tra 1.2 e 3.5mm, in caso di positività del linfonodo sentinella, la sopravvivenza melanoma-specifica a 10 anni è del 62.1%, rispetto al 85.1% dei pazienti con linfonodo indenne. All'analisi multivariata lo status del linfonodo sentinella risulta essere un fattore prognostico indipendente.^{17,133}

Secondo le linee guida attualmente in uso la tecnica del linfonodo sentinella risulta attualmente indicata in caso di spessore di Breslow compreso tra 0.8 mm – 4.0 mm ed in caso di spessore >4mm. Linfonodi positivi vengono riscontrati nel 10-20% dei casi nel primo gruppo e nel 30-40% dei casi nel secondo. Nei pazienti con melanoma sottile (<0.8mm) ma con presenza di ulcerazione (stadio IB), è attualmente indicata l'esecuzione del linfonodo sentinella.^{17,109,132,133}

Metastasi linfonodali

La sede più frequente di metastatizzazione del melanoma è rappresentata dai linfonodi loco regionali. Il distretto linfatico interessato dipende dalla localizzazione della neoplasia primitiva:

- per il distretto testa-collo sono considerati locoregionali i linfonodi latero-cervicali,
- per i tumori localizzati al tronco sopra la linea di Sappey (ombelico-cresta iliaca-seconda vertebra lombare) e dell'arto superiore sono considerati loco-regionali i linfonodi ascellari,
- per i melanomi del tronco sotto la linea di Sappey e nei melanomi dell'arto inferiore si considerano loco-regionali i linfonodi inguinali.^{17,109,132}

Talvolta la sede cutanea interessata dal melanoma primitivo può drenare in sedi multiple, anche controlaterali, oppure in sedi non prevedibili. La dissezione linfonodale completa viene generalmente consigliata a seguito di positività del linfonodo sentinella oppure in caso di riscontro all'esame clinico/strumentale di metastasi linfonodali sia al momento della diagnosi che durante il follow-up rappresentano le principali indicazioni alla chirurgia dei linfonodi loco regionali anche.¹⁷

Questa tecnica rappresenta un atto volto principalmente al controllo locale della malattia.¹³⁴

A livello laterocervicale l'intervento consiste nella asportazione di tutti i cinque livelli linfonodali e può anche essere presa in considerazione la parotidectomia superficiale, in caso di melanoma dell'emivolto omolaterale ed evidenza di coinvolgimento di linfonodi intraparotidei. Se la stazione linfonodale colpita è quella ascellare, devono essere asportati tutti e tre i livelli linfonodali. In caso di localizzazione a livello inguinale, dovrebbero essere asportati i linfonodi inguinali, iliaci ed otturatori. Il più grande studio (N = 1934) multicentrico selettivo randomizzato Lymphadenectomy Trial (MSLT)-II volto a valutare l'impatto della dissezione linfonodale completa versus l'osservazione linfonodale con ultrasuoni nei pazienti con linfonodo sentinella positivo ha dimostrato che la procedura di dissezione aumenta il tasso di regionale controllo della malattia con miglioramento della stadiazione tra i pazienti con un linfonodo sentinella positivo ma non aumenta la sopravvivenza specifica per il melanoma nei pazienti con metastasi linfonodali in un periodo di follow-up mediano di 43 mesi. Questi dati unitamente a numerosi studi retrospettivi presenti sull'argomento pongono la questione se dissezione linfonodale completa sia sempre indicata in caso di positività al linfonodo sentinella, data la morbilità associata.^{17,133,134}

Metastasi in transit

La diffusione linfatica regionale denominata “metastasi in transit” o “satellitosi”, si compone di localizzazioni multifocali, sia cutanee che sottocutanee, tra la sede primitiva del tumore e la

stazione di drenaggio linfatico regionale corrispondente. Rappresenta un evento importante, infatti il 20% delle recidive di melanomi cutanei avviene mediante metastasi in transit o per satellitosi. Le scelte terapeutiche da attuarsi possono essere diverse, e variano a seconda del numero, dimensioni e sede delle lesioni in transit. In caso di lesione singola o basso numero di lesioni, può essere proposta l'asportazione chirurgica, con eventuale esecuzione del linfonodo sentinella.^{17,109,132}

In caso di metastasi multifocali o di difficile asportazione, la chirurgia risulta controindicata. Si ricorre in questi casi a terapie sistemiche: perfusione ipertermica antitumorale isolata dell'arto, infusione isolata dell'arto ed elettrochemioterapia (ECT). La perfusione ipertermica antitumorale isolata dell'arto consiste nel perfondere, dopo aver chirurgicamente incanalato i vasi e in condizioni di ipertermia per potenziare l'effetto farmacologico, alte dosi di chemioterapici o associazioni di più farmaci (es: Melphalan+TNF) in modo da ottenere concentrazioni tissutali 10-100 volte superiori rispetto a quelle raggiungibili con la somministrazione sistemica, generando minori effetti collaterali. La metodica risulta però gravata dallo 0,5-1% di casi di tossicità grave dell'arto, con successiva amputazione.^{17,109,135}

L'infusione isolata dell'arto invece, effettuata tramite metodica percutanea, in normotermia, senza ossigenatore in ipossia ed acidosi, risulta essere pratica meno invasiva e meglio tollerata. L'elettrochemioterapia si basa sul principio biofisico dell'elettroporazione, cioè la capacità dei campi elettrici esterni di aumentare la permeabilità delle membrane cellulari a varie sostanze tra cui i farmaci chemioterapici. La tecnica, recentemente standardizzata dallo studio ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemiotherapy), prevede l'applicazione di brevi ed intensi impulsi elettrici tramite un elettrodo in anestesia locale ed è possibile sia la somministrazione venosa che locale del farmaco. Possono essere svolte più sedute terapeutiche, ma risulta più difficile ottenere risposte complete con lesioni numerose o >3cm. L'ECT è una metodica promettente, che può essere impiegata in caso di fallimento o inapplicabilità delle altre tecniche ed è l'unica che risulta applicabile in tutto l'ambito corporeo.^{17,135}

Delle tre tecniche citate la perfusione isolata dell'arto è quella che garantisce un maggior numero di risposte complete; tale fattore influenza positivamente la sopravvivenza del paziente, per cui, se applicabile, rappresenta ad oggi la metodica di scelta. L'infusione è un valido compromesso nel paziente anziano/fragile, dato il minor numero di complicanze e la maggiore semplicità esecutiva.^{17,109,135}

Trattamento chirurgico delle metastasi a distanza

Le sedi più comuni di metastasi a distanza del melanoma sono rappresentate dal sistema nervoso centrale, il polmone ed il fegato. Più infrequente risulta il coinvolgimento di cute, osso e apparato gastrointestinale. La chirurgia delle localizzazioni metastatiche può essere intrapresa con due finalità: palliativa o curativa. La prima consiste nel raggiungere il trattamento di un sintomo che incide negativamente sulla qualità della vita del paziente, la seconda consente di raggiungere invece, in casi molto selezionati, sopravvivenze del 30% a 5 anni, difficilmente ottenibili con altre terapie.^{17,109,132}

Ogni singolo caso dovrebbe essere discusso da un panel multidisciplinare di esperti, per decidere la fattibilità di un approccio curativo chirurgico nel paziente metastatico. Il riscontro di malattia in stadio sempre più precoce e l'implementamento delle tecniche di imaging, consentono oggi di rilevare metastasi dimensionalmente e numericamente limitate. I principali parametri che vengono considerati per valutare la fattibilità della chirurgia curativa comprendono:

- il numero di metastasi (più di tre metastasi in un singolo organo depongono per riduzione significativa della sopravvivenza),
- sede di metastatizzazione (l'interessamento di cute, sottocute, linfonodi extraregionali, apparato gastrointestinale si associa a prognosi migliore, al contrario fegato e cervello a prognosi peggiore),
- numero di organi interessati (più di 3 organi suggeriscono una prognosi peggiore),
- intervallo libero da malattia (se > 36 mesi è un fattore suggestivo di una maggiore sopravvivenza),
- tempo di raddoppiamento delle metastasi, specie se polmonari (se <60 giorni la sopravvivenza a 5 anni risulta estremamente compromessa),
- dosaggio dell'LDH sierico.^{17,109,132}

Terapia adiuvante

La terapia adiuvante risulta indicata in casi in cui il rischio di recidiva è maggiormente elevato (II-III). Lo scopo è quello di ridurre l'insorgenza di recidive e di migliorare le percentuali di sopravvivenza. La stadiazione AJCC identifica 3 categorie di rischio di recidiva: gli stadi IB e

IIA, rientrano nel basso rischio di recidiva, mentre gli stadi IIB-C e qualunque stadio III, vengono considerati ad alto rischio di recidiva di malattia.^{17,136}

Al momento attuale, come raccomandato dalle linee guida più recenti sull'argomento, nei pazienti affetti da melanoma stadi II-III non è consigliato intraprendere terapia adiuvante con interferone a basso dosaggio (3mUI sottocute per 2 anni) alla luce delle terapie attualmente disponibili in setting adiuvante. Può tuttavia essere preso in considerazione nei casi di melanoma ulcerato e in stadio IIB o IIC, per i quali non sono disponibili terapie adiuvanti di nuova generazione (immunoterapia e target therapy).^{17,109,136}

Al contrario, il trattamento adiuvante con dabrafenib+trametinib, con nivolumab e con pembrolizumab ha ottenuto la rimoborsabilità da AIFA nel 2019. Le prove a sostegno dell'uso di un anti PD-1 (pembrolizumab) derivano dall'analisi dello studio randomizzato di fase III EORTC 1325/Keynote-54, in cui sono stati arruolati pazienti in stadio IIIA (se N1a con metastasi linfonodali > 1mm), IIB e IIC (secondo AJCC 7). Il primary endpoint era la *recurrence free survival* (RFS) nella popolazione ITT e nel sottogruppo PD-L1 positivo. I pazienti dopo exeresi chirurgica venivano randomizzati a ricevere pembrolizumab 200 mg q21 per 18 dosi vs placebo. Lo studio, in doppio cieco, ha arruolato 1019 pazienti. Ad un follow-up mediano di 15.1 mesi, la RFS a 12 mesi nel braccio di trattamento attivo vs placebo era di 75.4% (95% CI, 71.3-78.9) vs 61.0% (95% CI, 56.5-65.1) con un HR=0.57(98.4% CI, 0.43-0.74; P<0.001). A 18 mesi la RFS era del 71.4% vs 53.2% nel braccio di trattamento vs placebo, rispettivamente. Nel sottogruppo di pazienti con PD-L1 positivo (n=853) la RFS a 12 mesi è stata del 77.1% vs 62.6% nel braccio pembrolizumab e placebo, rispettivamente; il trattamento si è dimostrato efficace anche nel sottogruppo PD- L1 negativo e nel sottogruppo PD-L1 non determinato. A 18 mesi, l'evento di ripresa di malattia a distanza come primo sito di ricaduta è stato del 16.7% vs 29.7% nel braccio di terapia vs placebo con un HR= 0.53 (99% CI, 0.37-0.76). Gli eventi avversi di grado 3-5 sono stati del 14.7% e 3.4% nel gruppo pembrolizumab e placebo, rispettivamente. Da segnalare un decesso in relazione a miosite nel braccio pembrolizumab. Il 13% dei pazienti in trattamento con pembrolizumab hanno interrotto il trattamento per evento avverso legato al trattamento. Non sono ancora disponibili i dati di OS (da segnalare che in questo studio era prevista la possibilità di trattamento con pembrolizumab in entrambi i bracci in caso di ripresa di malattia).^{17,109,136}

Sempre per quanto riguarda l'efficacia dell'immunoterapia in setting adiuvante, lo studio EORTC 18071 ha valutato l'efficacia dell'ipilimumab nel melanoma in stadio III. Lo studio, randomizzato, di fase III, in doppio cieco ha confrontato un trattamento con ipilimumab 10 mg/Kg (fase di induzione ogni 3 settimane per 4 cicli seguito da una fase di mantenimento ogni

12 settimane fino a 3 anni) vs placebo in 951 pazienti. Il primary endpoint era la recurrence free survival (RFS). Ipilimumab ha dimostrato un miglioramento della RFS con un HR=0.75 (95%CI 0.64-0.90) con una mediana di 26.1 vs 17.1 mesi. Il trattamento con ipilimumab ha indotto il noto profilo di tossicità immunorelate, da segnalare tuttavia che il 52% dei pazienti ha dovuto interrompere il trattamento per eventi avversi e che sono state registrate 5 morti tossiche (1.1%). Solo il 29% dei pazienti ha ricevuto il trattamento di mantenimento per 1 anno. Nell'aggiornamento successivamente pubblicato (19), con un followup mediano di 5.3 anni, la OS a 5 anni è stata di 65.4% nel braccio ipilimumab vs 54.4% nel braccio placebo (HR=0.72; 95.1%CI, 0.58- 0.88; P=0.001). Da segnalare che FDA ha approvato il trattamento con ipilimumab in adiuvante nello stadio III, mentre in Europa non è approvato per questa indicazione. Sono stati pubblicati anche i dati in adiuvante dello studio Checkmate, in cui pazienti in stadio IIIB-IIIC o IV NED (secondo AJCC 7), dopo exeresi chirurgica venivano randomizzati a ricevere ipilimumab 10 mg/Kg q21 per 4 dosi e poi ogni 12 settimane oppure nivolumab 3 mg/Kg q14, la durata totale del trattamento per entrambi i bracci era di 12 mesi (20). Lo studio di fase III, doppio cieco, ha arruolato in totale 906 pazienti. Il primary endpoint era la RFS. Ad un follow-up minimo di 18 mesi, la RFS a 12 mesi è stata del 70.5% (95% CI 66.1-74.5) e del 60.8% (95% CI 56.0-65.2) con un HR=0.65 (97.56% CI = 0.51-0.83, p<0.001) nel braccio con nivolumab vs ipilimumab, rispettivamente. L'incidenza di eventi avversi di grado 3 o 4 correlati al trattamento è stata pari al 14.4% nel braccio con nivolumab e del 45.6% nel braccio con ipilimumab. Il tasso di interruzione anticipata del trattamento a causa di eventi avversi è stato del 9.7% e del 42.6% nel braccio con nivolumab e ipilimumab, rispettivamente. Sono stati successivamente pubblicati i i dati aggiornati a 4 anni: il trattamento con nivolumab si è confermato superiore con una RFS del 51.7% vs 41.2% (HR=0.71, 95%CI 0.60-0.86). La OS a 4 anni è stata del 77.9 vs 76.6% (HR= 0.87, 95% CI= 0.66- 1.14) nel braccio nivolumab vs ipilimumab, rispettivamente. Sono stati riportati eventi avversi correlati al trattamento a insorgenza tardiva nel 1% e nel 2% dei pazienti trattati con nivolumab e ipilimumab, rispettivamente. Nei pazienti con melanoma in stadio IIIA (con metastasi al linfonodo sentinella di almeno 1 mm), IIIB, IIIC, IIID e mutazione BRAF V600 una terapia adiuvante con dabrafenib e trametinib dovrebbe essere presa in considerazione come prima opzione terapeutica. Le prove derivano dall'analisi dello studio COMBI-AD, di fase III randomizzato, in doppio cieco (23). Questo studio ha arruolato 870 pazienti in stadio IIIA (con una metastasi linfonodale superiore a 1 mm), IIIB o IIIC (secondo AJCC 7) e presenza di mutazione BRAF V600E/K. I pazienti sono stati randomizzati a ricevere dabrafenib 150 mg x2 die + trametinib 2 mg die per 12 mesi vs placebo, dopo chirurgia radicale. Ad un follow-up minimo di 2.5 anni (mediana 2.8 anni), la RFS

(primary endpoint dello studio) stimata a 3 anni è stata del 58% vs 39% nel gruppo di terapia vs placebo, rispettivamente. Il rischio di ripresa di malattia è stato ridotto del 53% nel braccio che ha ricevuto terapia rispetto al gruppo di controllo (HR= 0.47, 95% CI 0.39-0.58, $p<0.001$). La OS stimata a 3 anni è stata del 86% vs 77% nei due gruppi, con un HR=0.57 (95% CI 0.42-0.79, $p=0.0006$) a favore del braccio di trattamento, questo dato tuttavia non può essere considerato significativo considerato i limiti statistici imposti dalla interim analysis. L'analisi per sottogruppi non ha evidenziato particolari differenze. All'update dello studio con un followup mediano di 44 mesi per il braccio di trattamento e di 40 mesi per il braccio placebo (24), la RFS a 4 anni è stata del 54% vs 38% nel braccio di trattamento vs placebo, rispettivamente. La Distant Metastasis Free Survival (DMFS) ha dimostrato un DMFS HR =0.53 (95% CI,0.42- 0.67). Anche un'analisi post hoc, condotta ristadiando i pazienti arruolati secondo la versione 8° della AJCC, non ha evidenziato modificazioni clinicamente significative dei risultati osservati. Il tasso di eventi avversi di grado 3 o 4 è stato del 41% vs 14% nel gruppo di dabrafenib+trametinib vs placebo, rispettivamente; il 26% dei pazienti in trattamento con la target therapy ha dovuto interrompere il trattamento anticipatamente per eventi avversi. ^{17,109,132,136}

Terapia medica della malattia metastatica

Fino a pochi anni fa lo scopo del trattamento della malattia metastatica non operabile poteva considerarsi quasi esclusivamente palliativo, dal momento che l'uso dei chemioterapici tradizionali a disposizione associava ad un effetto limitato e non curativo nella maggior parte dei casi, con sopravvivenze medie di pochi mesi e con meno del 5% dei pazienti vivi a 5 anni. Negli ultimi anni il progressivo affermarsi di nuovi farmaci ha permesso di osservare importanti vantaggi in termini di sopravvivenza, come nel caso dell'immunoterapia con anti CTLA4 (ipilimumab) e anti PD1e anti PD1 ligando (nivolumab, pembrolizumab) e dei farmaci a target molecolare quali BRAF inibitori (vemurafenib, dabrafenib, trametinib) e anti MEK (encorafenib, binimetinib, cobimetinib).^{17,136}

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

numero di risposte il trattamento non è approvato in Europa (ma è approvato dalla FDA in USA ed incluso nelle linee guida NCCN).^{109,132,136}

Il trattamento immunoterapico meglio caratterizzato per la malattia metastatica, è la terapia con ipilimumab. Si tratta di una immuno-target-therapy, in quanto operata tramite anticorpi monoclonali specificatamente diretti contro un target, che agiscono sul sistema immunitario del paziente e non direttamente sulla neoplasia. Altre molecole oggi in uso sempre appartenenti a questa classe farmacologica, sono il nivolumab ed il pembrolizumab.^{17,136}

L'ipilimumab è un anticorpo monoclonale diretto contro il recettore CTLA-4 dei linfociti T attivati. Il legame di CTLA-4 con il suo ligando naturale, la molecola B7, genera un segnale disattivante la risposta immunitaria e tale via di segnalazione è sfruttata dalle cellule tumorali per indurre anergia nei linfociti T. Il legame del farmaco al CTLA-4 impedisce l'innescamento dello stato di anergia, traducendosi in un potenziamento dell'azione del sistema immunitario del paziente. Si tratta del primo farmaco che ha dimostrato di comportare un beneficio di sopravvivenza in un consistente numero di pazienti con melanoma metastatico. Secondo gli studi attuali, la sopravvivenza a 3 anni del paziente metastatico che riceve terapia con ipilimumab è del 20,8% (contro il 12,2% dei pazienti che hanno ricevuto placebo). Tale immunoterapia ha ricevuto l'approvazione della FDA e dell'EMA per il trattamento del melanoma metastatico. Nel febbraio 2013 l'AIFA ha approvato la rimborsabilità del trattamento con ipilimumab nei pazienti affetti da melanoma avanzato pretrattati e recentemente anche per la prima linea. Il farmaco viene somministrato alla dose di 3 mg/Kg ogni 3 settimane, per 4 somministrazioni totali.¹³⁶

La risposta alla terapia somministrata può essere diversa da quella attesa con i classici chemioterapici, in particolare si segnalano numerose risposte tardive, verificatesi a distanza di mesi dal trattamento, dopo periodi di apparente progressione della malattia o dopo la comparsa di nuove lesioni. Gli effetti collaterali, immuno-correlati, come affaticamento, diarrea, e colite compaiono nella maggior parte dei casi nelle prime 12 settimane di terapia. Sono state inoltre riportate tossicità epatiche, tiroidee e ipofisarie, tutte ad origine autoimmune. Gli effetti avversi immuno-correlati più frequenti sono però quelli riguardanti l'ambito cutaneo. Tra questi il rash risulta essere il più comune con carattere maculo-papulare, diverso da quello riscontrato con altri farmaci target oncologici impiegati nella cura di altre neoplasie, come Erlotinib o Cetuximab.¹⁸²

Altro effetto avverso cutaneo riscontrato frequentemente è rappresentato dal prurito, esso può accompagnare il rash, ma può anche essere presente in assenza di lesioni cutanee. Alopecia e vitiligine sono altri possibili effetti collaterali, tra i rari si annovera la sindrome di Stevens-Johnson. Il trattamento delle tossicità dermatologiche prevede l'utilizzo di corticosteroidi topici ed anti-istaminici orali per i casi più lievi, corticosteroidi sistemici (1-2mg/kg/die di prednisone o

equivalenti) nei casi di prurito grave, a cui è possibile associare anche l'utilizzo di gabapentin, pregabalin, mirtazapina o aprepitant.^{17,136}

Ulteriori farmaci immunoterapici attualmente in uso sono nivolumab e pembrolizumab, diretti contro l'interazione tra PD1 e PD1-ligando. L'energia delle cellule T si può ottenere anche per l'interazione tra PD1 (molecola espressa sulla superficie dei linfociti) e PDL1, espressa sulle cellule presentanti l'antigene e su alcune cellule tumorali e tessuti. Recenti studi hanno dimostrato attività ed efficacia della combinazione di anti CTLA-4 e anti PD-1. Un iniziale studio di fase I che ha combinato ipilimumab e nivolumab, ha evidenziato un tasso di risposte obiettive fino al 53%. Successivamente, la combinazione di ipilimumab (antiCTLA4) e nivolumab (antiPD1) ha dimostrato in uno studio di fase II randomizzato in prima linea (combinazione vs ipilimumab single agent) un tasso di risposte obiettive pari al 61% nei pazienti con BRAF wild-type e al 52% nei pazienti con mutazione di BRAF. In entrambi le cohorti il tasso di risposte complete è stato del 22%. La mediana del PFS non è stata raggiunta nel gruppo wildtype mentre è stata pari a 8.5 mesi nel gruppo BRAF mutato. L'ipilimumab come agente singolo ha dimostrato un tasso di risposte obiettive più basso, pari al 10-11%.^{17,136}

Il nivolumab è stato approvato dall'EMA per il trattamento del melanoma avanzato in prima e successive linee di trattamento indipendentemente dallo status mutazionale. Il pembrolizumab, è stato approvato dall'EMA nelle stesse indicazioni del nivolumab il 22 maggio 2015; nel settembre 2014 era già stato approvato da FDA per il trattamento di pazienti con melanoma avanzato e resistenti al trattamento con ipilimumab (in caso di positività alla mutazione di BRAF devono aver ricevuto anche un trattamento con inibitori di BRAF).¹³⁶

Il trattamento con farmaci anti PD-1 (pembrolizumab e nivolumab) presenta un profilo di tollerabilità accettabile, migliore rispetto ad ipilimumab e nettamente diverso dal trattamento chemioterapico. In genere la maggior parte degli eventi avversi sono di tipo immunomediato, gestibili con terapia sintomatica o immunomodulante (es. steroidi) a seconda del grado e della durata dell'evento. E' basso il tasso di interruzione del trattamento con anti PD-1 per tossicità (range negli studi esaminati del 3- 8%). Considerato il beneficio in sopravvivenza e il profilo di tollerabilità, attualmente il trattamento con pembrolizumab e nivolumab è preferito all'ipilimumab con dose flat nel melanoma metastatico.^{17,136}

L'efficacia di vemurafenib e dabrafenib, nella terapia del melanoma metastatico, è già stata ampiamente dimostrata e sulla base di tali risultati il vemurafenib è stato approvato nel trattamento del melanoma avanzato con mutazione V600 del gene B-RAF, dall'FDA nell'agosto 2011 e dall'EMA nel febbraio 2012, successivamente è stato approvato dall'AIFA in Italia. Si tratta di farmaci attivi contro melanomi caratterizzati, a livello molecolare, dalla mutazione V600

e non attivi su cellule tumorali che non albergano la mutazione. La percentuale di risposte globali con il vemurafenib ammonta al 53%, con una riduzione relativa del rischio di morte del 38% e di progressione della malattia del 66%. L'incremento mediano della sopravvivenza è di 3 mesi rispetto ai pazienti trattati con chemioterapia classica (13,6 mesi di sopravvivenza mediana con vemurafenib, contro 9,7 dei pazienti trattati con chemioterapia). La tossicità riscontrata è prevalentemente cutanea, con la presentazione di fotosensibilizzazione, rash, cheratoacantomi e carcinomi squamocellulari. Artralgie ed astenia sono state riportate rispettivamente nel 21% e nel 13% dei casi.²⁴

Un ulteriore farmaco a bersaglio molecolare disponibile per i melanomi BRAF mutati è dabrafenib. Anch'esso si è dimostrato più efficace della chemioterapia tradizionale, con un profilo di tossicità del tutto simile al vemurafenib. L'iperpiressia rappresenta l'evento avverso peculiare rispetto agli altri farmaci. Il trattamento è stato approvato dal FDA nel maggio 2013 e dall'EMA nell'agosto 2013 per il melanoma avanzato con mutazione V600 del gene BRAF, in Italia è stato approvato nell'ottobre 2014. Il limite maggiore dei BRAF-inibitori è la breve durata della risposta, infatti solo una piccola parte dei pazienti è ancora in terapia dopo due anni di trattamento. In genere si tratta di pazienti con piccolo carico di malattia iniziale mentre nei pazienti con carico maggiore è probabile che si sviluppi piuttosto precocemente resistenza al trattamento.¹⁷

Il trametinib è un inibitore di MEK (mitogen-activated protein kinase), via molecolare situata a valle di BRAF. Il trametinib è un altro farmaco che ha dimostrato efficacia in pazienti con mutazione di BRAF e melanoma avanzato garantendo una sopravvivenza libera da progressione di lunga durata rispetto alla chemioterapia tradizionale (mediana 4.8 contro 1.5 mesi) e sopravvivenza maggiore. È risultata efficace anche la terapia di combinazione tra trametinib e dabrafenib, anche se il risultato rispetto al dabrafenib in monoterapia non è clinicamente significativo (incremento della sopravvivenza libera da progressione da 8,8mesi a 9,3mesi), ma le tossicità dei BRAF inibitori risultano attenuate con la combinazione.^{17,136}

L'aggiunta di un inibitore di MEK, come il trametinib, alla terapia con BRAF inibitori si è rivelata utile per by-passare la resistenza acquisita a questi ultimi, nel caso siano presenti meccanismi di resistenza MEK-dipendenti.¹³⁶

Attualmente infatti nei pazienti affetti da melanoma inoperabile o metastatico (stadio IIIc o IV) è pertanto raccomandata la valutazione dello stato di BRAF e in presenza di mutazione V600 è indicato il trattamento con dabrafenib + trametinib. Lo studio pubblicato da Long et al (36), COMBI-d, randomizzato di fase III, ha valutato il trattamento di combinazione dabrafenib+trametinib vs il trattamento con single agent dabrafenib+placebo in 423 pazienti con

melanoma (mutato BRAF V600 E o K) in stadio IIIC non resecabile o IV, in prima linea. L'obiettivo dello studio era valutare la superiorità in termini di PFS (endpoint primario) della combinazione vs la terapia con single agent. Endpoints secondari erano la Overall Survival (OS) e il Response Rate (RR). Il trattamento con dabrafenib+trametinib si è dimostrato superiore in termini di PFS (HR 0.67, 95% CI 0.53-0.84), OS (HR=0.7, 95%CI 0.55-0.92, mediana: NR vs 19.2 mesi) e RR (69% vs 53%). L'aggiornamento pubblicato nel 2017 riporta una OS a 3 anni del 44% nel braccio di combinazione, rispetto al 32% nel braccio di monoterapia.¹³⁶

Lo studio pubblicato da Robert et al (38), COMBI-v, randomizzato di fase III, ha valutato il trattamento di combinazione dabrafenib+trametinib vs il trattamento con vemurafenib single agent in 704 pazienti con melanoma (mutato BRAF V600 E o K) in stadio IIIC non resecabile o IV, in prima linea. L'obiettivo dello studio era valutare la superiorità in termini di OS (endpoint primario) della combinazione vs la terapia con single agent. Endpoints secondari erano la PFS e il RR. Il trattamento con dabrafenib+trametinib si è dimostrato superiore in termini di OS (HR=0.69, 95%CI 0.53-0.89, mediana NR vs 17.2 mesi), PFS (HR=0.56, 95% CI 0.46-0.69) e RR (64 vs 51%).^{17,136}

I farmaci inibitori di MEK inoltre sembrano possedere anche efficacia anche nei confronti di melanomi NRAS mutati, per i quali non esiste ad oggi terapia target.¹³⁶

Nel caso di melanomi delle mucose, delle zone acrali e delle aree esposte cronicamente al sole, è stata dimostrata la presenza di mutazioni del gene c-Kit che comportano la risposta al trattamento con c-Kit inibitori (imatinib e nilotinib). Diverse esperienze cliniche evidenziano risposte importanti con l'uso di c-kit inibitori nei melanomi che presentano mutazioni all'esone 9, 11, o 13. Studi al riguardo, con casistiche più ampie, sono attualmente in corso.¹⁷

Anche se l'ipilimumab e i farmaci BRAF e MEK inibitori hanno significativamente modificato lo scenario terapeutico del melanoma metastatico, vi sono limitazioni che impongono ulteriori studi. I futuri studi clinici cercheranno di migliorare l'efficacia di tali farmaci attraverso il disegno di regimi di combinazione o sequenziali sia con entrambi i farmaci sia associati ad altri chemioterapici, immunoterapici o farmaci a bersaglio molecolare. In particolare, si valuterà come coniugare i differenti pattern di risposta di questi due approcci: rapida e significativa riduzione del volume tumorale, anche in presenza di importante disease burden (BRAF inibitori); attività minore, lenta ma protratta nel tempo (ipilimumab). Attualmente è in corso di valutazione l'efficacia e la safety della terapia di combinazione con BRAF+MEK inibitore + inibitore dei checkpoint immunologici. Recentemente sono stati presentati alla AACR del 2020 (48) i primi dati di uno studio di fase III in doppio cieco nel melanoma avanzato con mutazione BRAF V600 (vemurafenib + cobimetinib +/- atezolizumab). Lo studio ha randomizzato 514

pazienti con melanoma in stadio avanzato e con mutazione di BRAF a ricevere in prima linea la combinazione vemurafenib + cobimetinib + placebo oppure vemurafenib+cobimetinib+atezolizumab. L'obiettivo primario era la PFS secondo gli sperimentatori, mentre obiettivi secondari erano la PFS centralizzata, la OS, la risposta obiettiva, la durata della risposta e la tollerabilità. Era previsto un primo ciclo di run-in con sola target therapy anche nel braccio sperimentale; da segnalare inoltre che nel braccio sperimentale la dose di vemurafenib era ridotta a 720 mg x2 die (rispetto al braccio di controllo dove la dose standard era 960 mg x2 die). La PFS mediana era di 15.1 vs 10.5 mesi nel braccio sperimentale vs controllo, rispettivamente (HR=0.77, 95% CI 0.62-0.96). La OS mediana era 28.8 vs 25.1 mesi, la RR era pari a 66.3% vs 65.0%, la durata della risposta era di 21.0 vs 12.6 mesi nel braccio sperimentale vs braccio di controllo, rispettivamente. Il profilo di safety è stato compatibile con la nota tossicità dei trattamenti a target molecolare e immunoterapia (da segnalare AE di grado 5 nel 3.0 vs 2.5% e interruzione del trattamento per evento avverso nel 12.6% vs 15.7% dei casi nel braccio sperimentale vs controllo, rispettivamente).^{17,136}

All'ESMO 2020 sono stati presentati i dati della fase 3 del trial di fase III randomizzato in doppio cieco COMBI-I trial (dabrafenib+trametinib+ spartalizumab vs dabrafenib+trametinib+placebo). Lo studio ha randomizzato 532 pazienti con melanoma avanzato e mutazione BRAF V600. L'Obiettivo primario era la PFS. La PFS mediana era di 16.2 vs 12.0 mesi nel braccio con dabrafenib+trametinib+spartalizumab vs dabrafenib+trametinib (HR=0.80, 95%CI 0.65-1.02, p=0.042, 1 side, non significativa). I dati di OS hanno dimostrato una OS a 2 anni pari a 68% vs 62% nel braccio sperimentale vs controllo, rispettivamente (49). Al meeting annuale della SMR del 2019 sono stati presentati i dati della parte 3 dello studio clinico di fase II randomizzato in doppio cieco KEYNOTE-022. Questo studio ha randomizzato 120 pazienti con melanoma avanzato e mutazione BRAF V600 E/K a ricevere dabrafenib+trametinib+pembrolizumab vs dabrafenib+trametinib+placebo in prima linea. L'obiettivo primario era la PFS obiettivi secondari erano la PFS centralizzata, la OS, la risposta obiettiva, la durata della risposta. La PFS mediana è stata di 16.9 vs 10.6 mesi nel braccio sperimentale vs controllo. La RR è stata del 63% vs 72% nel braccio, con una durata mediana di risposta di 25.1 mesi vs 12.1 mesi nel braccio sperimentale vs controllo, rispettivamente. La OS a 24 mesi è stata del 63% vs 52% nel braccio sperimentale vs controllo, rispettivamente. Eventi avversi di grado 3-5 correlati al trattamento sono stati registrati nel 58.3% vs 25% dei casi il trattamento è stato interrotto per evento avverso nel 30% vs 16.7% dei casi nel braccio sperimentale vs controllo rispettivamente.^{17,136}

Per quanto riguarda i chemioterapici tradizionali, gli unici tre farmaci che hanno dimostrato di possedere debole attività nel melanoma metastatico sono fotemustina, dacarbazina e temozolomide, ma nessuno dei tre ha dimostrato di poter migliorare il dato della sopravvivenza. La dacarbazina e la temozolomide sono in grado di attraversare la barriera emato-encefalica e possono rivestire pertanto un ruolo nel paziente con metastasi cerebrali. Il trattamento con chemioterapia trova oggi indicazione dopo trattamento con farmaci BRAF inibitori o con ipilimumab. La radioterapia può essere usata solo come terapia palliativa, non è infatti in grado di modificare la sopravvivenza, in caso soprattutto di metastasi cerebrali. La radioterapia palliativa è inoltre utile in caso di lesioni osse sintomatiche ed a rischio di frattura e può rivelarsi utile per il controllo della sintomatologia su varie localizzazioni metastatiche, tra cui: vertebre, linfonodi addominali o pelvici (che possono provocare dolore per compressione o stasi linfatica), lesioni cutanee e sottocutanee ulcerate e sanguinanti, masse linfonodali mediastiniche.¹⁷

Trattamento delle recidive locali

Le recidive locali di melanoma si definiscono sulla base della distanza che intercorre tra loro e la lesione primitiva.¹⁷

Si suddividono in:

- recidive locali “vere”, (lesione in contiguità della cicatrice chirurgica e con componente in situ),
- satellitosi/metastasi in transit, (lesione cutanea-sottocutanea posta entro 5cm dalla primitiva o entro 2cm dalla cicatrice, o che supera questi limiti, localizzandosi tra la lesione primaria ed il sito di drenaggio),
- metastasi a distanza (lesioni cutanee secondarie, localizzate in qualsiasi distretto, che non soddisfano i criteri precedenti).^{17,109,132}

È importante distinguere le recidive locali “vere”, definite come la ricomparsa del melanoma con presenza di una componente istologica di neoplasia in situ chiaramente identificabile, all’interno o in contiguità con la cicatrice chirurgica (recidiva su cicatrice, “true local scar recurrence” o “persistent disease” secondo linee guida NCCN).¹³²

Questa evenienza è considerata il risultato di una incompleta escissione della malattia, è ad oggi di raro riscontro, ma ha buona prognosi, al contrario delle altre forme di secondarismi cutanei. In caso quindi di sospetta recidiva locale su cicatrice del precedente intervento, la diagnosi può

essere posta con biopsia escissionale secondo linee guida NCCN (National Comprehensive Cancer Network). Il paziente deve essere stadiato nuovamente mediante adeguati esami strumentali, la lesione escissa con 2 cm di margine, e può essere presa in considerazione l'esecuzione del linfonodo sentinella in accordo con le caratteristiche istologiche della malattia. Dopo l'intervento chirurgico esiste l'opzione di trattamento con interferone a seconda dei parametri di stadiazione.^{17,132}

A livello clinico è molto importante rilevare che spesso le recidive di melanoma su cicatrice sono costituite da lesioni pigmentate che crescono direttamente a partire dalla cicatrice stessa, espandendosi nel tessuto sano circostante. Talvolta è possibile osservare questa evenienza non solo dopo l'asportazione di un melanoma, ma anche dopo l'asportazione di un nevo displastico, a distanza di mesi o anni dall'intervento, o di lesioni che erano state classificate come nevi melanocitici del tutto benigni. In ogni caso, indipendentemente dalla lesione precedentemente asportata, l'accrescimento di una nuova lesione pigmentata a partire dalla cicatrice con espansione nel tessuto circostante, rappresenta un segno fortemente sospetto della presenza di cellule maligne. In una recente serie di casi clinici, all'esame istologico è sempre stato rilevato un melanoma, spesso in situ.¹⁷

Tradizionalmente, la satellitosi è stata definita come una lesione secondaria localizzata entro 5cm dalla lesione primitiva, o entro 2cm dalla cicatrice escissionale, mentre le metastasi in transit sono state definite come lesioni poste a distanza maggiore, localizzate tra la lesione primitiva ed il sito di drenaggio linfatico loco-regionale. Oggi queste lesioni vengono considerate, in entrambi i casi, il risultato di una diffusione tumorale lungo le vie di drenaggio linfatico, con prognosi simile, assimilabile a quella di un paziente con metastatizzazione linfonodale (come da stadiazione TNM AJCC), assai peggiore quindi rispetto a quella di una recidiva locale "vera". Le metastasi cutanee a distanza hanno prognosi ancora peggiore (stadio IV TNM), ma migliore rispetto ad altre localizzazioni sistemiche.¹⁰⁹

Follow-up del paziente

La sorveglianza dermatologica è fortemente raccomandata in tutti i pazienti con anamnesi positiva per melanoma. La frequenza dei controlli differisce a seconda dello stadio della malattia e può essere adattata sulla base di altre caratteristiche individuali del paziente, tra i quali anamnesi familiare positiva, presenza di nevi displastici, numero di nevi e fototipo. E' opportuno suggerire al paziente l'esecuzione della *skin self examination* ed dell'autopalpazione delle stazioni linfonodali regionali. Per i pazienti con melanoma in situ è indicata l'esecuzione di una

visita periodica annuale; nel caso di pazienti con numerosi nevi melanociti multipli comuni e/o atipici si può procedere con una valutazione semestrale.¹⁷

Per i pazienti con melanoma in stadio IA viene consigliato un controllo clinico specialistico ogni 6-12 mesi a giudizio del clinico per almeno 5 anni; dopo il 5° anno si procede con controlli clinici annuali fino al 10° anno. L'ecografia delle stazioni linfonodali e dell'area pericicatrizziale relative alla lesione primitiva risulta opzionale ed eseguibile ad ogni controllo clinico per i primi 5 anni. Per i pazienti in stadio IB-IIB viene consigliata una visita clinica specialistica ogni 6 mesi per i primi 5 anni, mentre negli stadi IIC-IV quindi ogni 3 mesi per i primi 2 anni e ogni 6 mesi dal 3° al 5° anno ed in seguito annualmente.^{17,132}

Nello stadio IB-IIA a livello strumentale è prevista l'esecuzione di ecografia addome (ogni 12 mesi); ecografia delle stazioni linfonodali e dell'area pericicatrizziale relative alla lesione primitiva ogni 6 mesi per i primi 5 anni. Nello stadio IIB è prevista la TAC Torace (ogni 12 mesi); ecografia addome ed ecografia delle stazioni linfonodali relative alla lesione primitiva e dell'area pericicatrizziale (ogni 6 mesi). Nello stadio IIC-III è prevista la TAC o in alternativa PET/TAC ogni 6-12 mesi per i primi 3 anni, quindi annualmente fino al 5° anno; ecografia delle stazioni linfonodali relative alla lesione primitiva e dell'area pericicatrizziale (ad ogni controllo clinico); eventuale ecografia epatica (es. qualora eseguita PET/TAC). In caso di melanoma IV stadio TAC total body o PET/TAC ogni 3-6 mesi.¹⁷

La durata ottimale del follow-up non è ancora stata chiarita in quanto la ricaduta nei soggetti affetti da melanoma avviene generalmente nei primi 5 anni, ma recidive a distanza maggiore, talvolta anche oltre i 10 anni dall'atto chirurgico, sono documentate anche nei pazienti con melanomi sottili.¹⁷

È fortemente consigliata una visita specialistica dermatologica annuale per il resto della vita in tutti i soggetti che hanno anamnesi positiva per melanoma, dato il rischio pari al 4-8% di sviluppare un secondo melanoma.¹⁷

TESSUTO ADIPOSO

STRUTTURA, CARATTERISTICHE ED ESPRESSIONE CITOCHINICA

Tessuto adiposo: classificazione e struttura

Dal punto di vista anatomico, il tessuto adiposo o organo adiposo, è contenuto in strutture disseccabili dal resto del corpo discernibili in compartimenti superficiali (sottocutaneo) e profondi (viscerali del tronco) Il tessuto adiposo è pertanto distinto in tessuto adiposo sottocutaneo (SCAT) e viscerale (VAT).¹³⁷ Il tessuto adiposo nel mammifero si compone di due citotipi fondamentali, gli adipociti bianchi e gli adipociti bruni, la cui distribuzione e rispettiva quantità varia da specie, genere, età e dalle condizioni ambientali e nutrizionali dell'individuo. Gli adipociti bianchi maturi, hanno tipicamente forma sferica ed il 90% del loro volume è occupato da una singola goccia di lipide (trigliceride); sono inoltre caratterizzati morfologicamente da un sottile strato citoplasmatico con scarsi organuli e da un nucleo a semiluna, schiacciati entrambi in periferia dal lipide. Gli adipociti bruni hanno dimensioni ridotte rispetto agli adipociti bianchi (circa 1/3) e presentano nucleo quasi centrale poligonale, numerosi vacuoli lipidici composti da trigliceridi sparsi nel citoplasma ricco in particolare di mitocondri. Essi sono organizzati in un tessuto riccamente vascolarizzato (che in parte conferisce la colorazione bruna al tessuto) e fibre nervose adrenergiche parenchimali che prendono contatto, con le loro espansioni sinaptoidi, direttamente con le singole cellule adipose.^{137,138}

Gli adipociti bianchi hanno come principale funzione quella di immagazzinare introdotta nel nostro organismo sotto forma di trigliceridi (che formano grandi lipidi uniloculari costituenti il loro citoplasma) e di liberarla quando è necessario sotto forma di 3 acidi grassi e 1 glicerolo.¹³⁹

Gli adipociti bruni hanno un ruolo diametralmente opposto da quello degli adipociti bianchi: sono infatti deputati alla termogenesi e dissipano pertanto l'energia convertendo gli acidi grassi in calore invece di produrre adenosina trifosfato (ATP). L'azione, guidata dallo stimolo adrenergico che si attiva all'esposizione al freddo, è mediata da una proteina specializzata presente nei mitocondri chiamata proteina 1 di disaccoppiamento, che induce termogenesi nel tessuto adiposo bruno disaccoppiando la fosforilazione ossidativa.¹⁴⁰

L'organo adiposo nell'adulto è composto principalmente da depositi sottocutanei e viscerali di tessuto adiposo bianco. Il tessuto adiposo sottocutaneo interessa l'intera superficie corporea; nella donna è particolarmente sviluppato in regione gluteo-femorale e mammaria mentre nel

maschio in sede addominale. Gran parte dei depositi viscerali è costituita da grasso mesenterico e omentale; depositi minori, con significato assimilabile al grasso viscerale dell'addome, si trovano in regione epicardica e nel mediastino.¹⁴¹

La presenza e la distribuzione del tessuto adiposo bruno nell'adulto è ancora oggetto di discussione. In precedenza era opinione comune che questo, diversamente dal neonato, fosse assente e che nell'adulto la termogenesi, non legata ad attività muscolare, non fosse necessaria o che fosse sostenuta da altri meccanismi. Questa assunzione è stata smentita da rilievi mediante tecniche di tomografia ad emissione di positroni con fluoro-deossiglucosio (18-FDG), di aree ipercaptanti, non attribuibili a tessuto patologico, ma dovute all'iperattività metabolica di raccolte di tessuto adiposo bruno in regione sovraclaveare, laterocervicale, paravertebrale e mediastinica.¹⁴¹

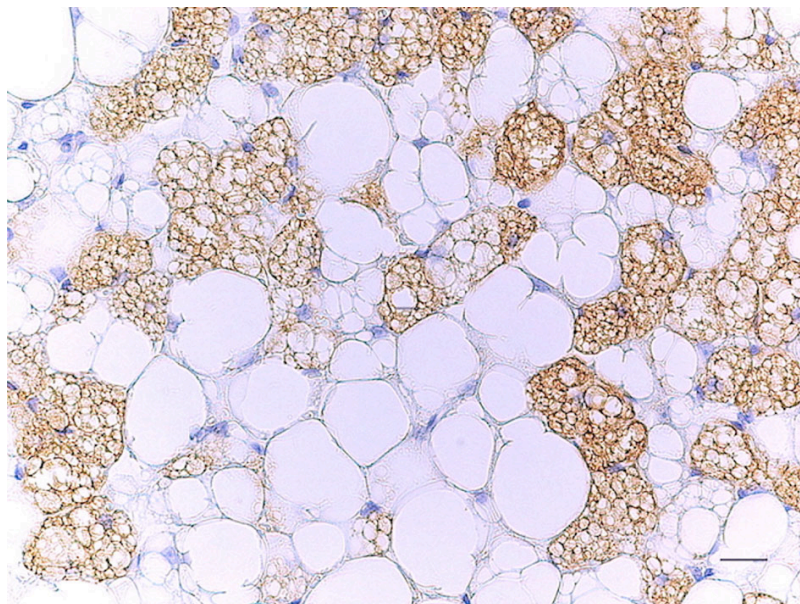


Figura 11. Istologia di una zona mista dell'organo adiposo. Sono visibili entrambi i citotipi: adipocita bianco (uniloculare) e adipocita bruno (multiloculare)

Il tessuto adiposo è stato considerato per decenni come tessuto con un ruolo scarsamente attivo nell'omeostasi energetica globale e primariamente coinvolto nel fornire un isolamento termico e meccanico con funzione primaria di riserva energetica.¹⁴²

Recentemente tuttavia tale definizione è stata completamente sovvertita ed oggi viene concepito come un organo dinamico, coinvolto in un'ampia gamma di processi biologici e metabolici. Questa diversa prospettiva è stata imposta dalla scoperta che il tessuto adiposo è un organo

endocrino. Gli adipociti sono infatti responsabili della secrezione di un'ampia gamma di ormoni, fattori e segnali proteici, denominati adipochine, che si associano al ruolo dell'adipocita nell'omeostasi energetica e che contribuiscono al determinismo dell'obesità, delle maggiori complicanze ad essa associate e sembrano detenere un ruolo chiave anche nella espressione e progressione di malattie neoplastiche (tra le quali il melanoma).¹⁴³⁻¹⁴⁷

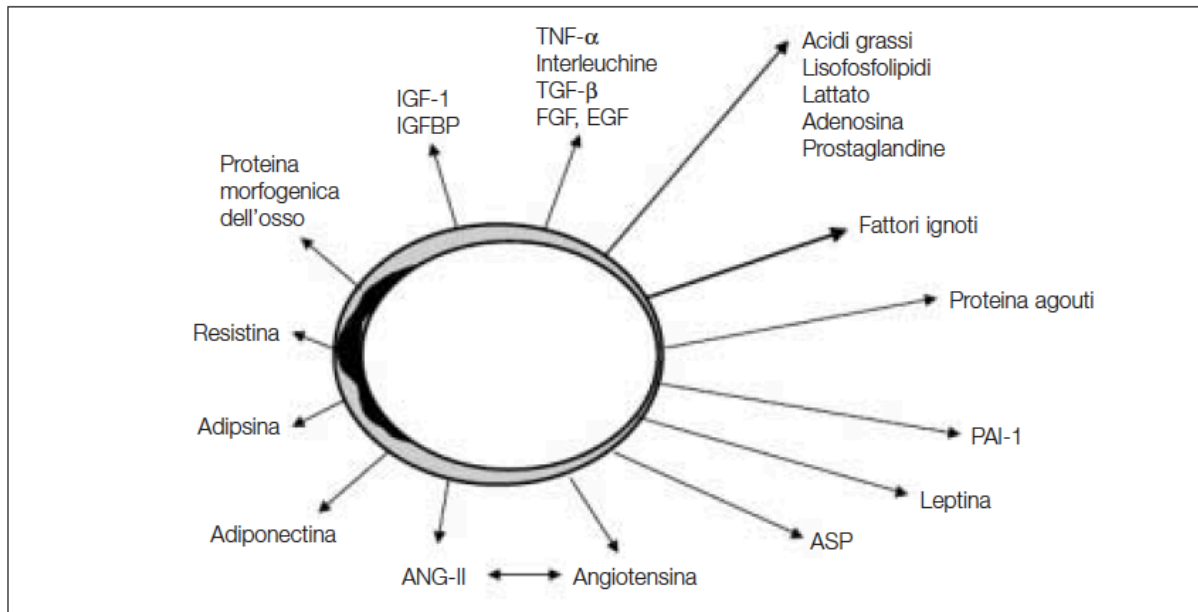


Figura 12. Elenco delle proteine e dei fattori secreti dalla cellula adiposa

Le adipochine

Il numero totale di adipochine documentate e putative ad oggi note, supera ormai le 50 unità. Le adipochine (o adipocitochine) includono ormoni, come leptina, adiponectina, visfatina, resistina, e citochine infiammatorie, come il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF α), la proteina 1 di chemiotassi dei monociti (MCP-1) e l'interleuchina-6 (IL-6).^{148,149}

Leptina

La leptina (dal greco *leptos*, cioè magro) è stata identificata nel 1994 e tale scoperta ha permesso di conferire agli adipociti la dignità di cellule endocrine. La leptina è un ormone di 16 kDa costituito da 167 amminoacidi e codificato dal gene *ob*, localizzato sul cromosoma 7.¹⁵⁰ La

leptina, secreta prevalentemente dagli adipociti, svolge un ruolo cardine nell'omeostasi energetica, segnalando all'ipotalamo la presenza di sufficienti riserve e regolando conseguentemente il fabbisogno alimentare.¹⁵⁰⁻¹⁵⁴ E' inoltre secreta, seppur in minima parte, da altri organi e tessuti tra i quali si annoverano la placenta, la mucosa gastrica, l'epitelio mammario, il midollo osseo, il muscolo scheletrico, l'ipotalamo e il tessuto osseo.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ La leptina è presente nel torrente circolatorio come peptide libero o associato ad altre proteine plasmatiche ed interagisce con il suo recettore trans-membrana OB-R, evento strutturale simile ai recettori delle citochine di classe I.^{158,159} Le mutazioni a carico del gene che codifica per il recettore della leptina responsabili di obesità ereditaria sono alla base delle disfunzioni metaboliche tipiche di questi individui tra le quali spiccano la costante ricerca di cibo, la sostanziale depressione delle attività motorie spontanee e un grave ritardo dello sviluppo del sistema riproduttivo.¹⁶⁰ Le funzioni svolte dalla leptina non si esauriscono a livello ipotalamico e non riguardano esclusivamente il mantenimento dell'omeostasi energetica, ma coinvolgono tutto il sistema nervoso centrale e periferico.^{161,162} La leptina, infatti, prende parte a numerosi processi fisiologici quali la regolazione del metabolismo, la crescita, lo sviluppo, la regolazione di processi endocrinologici ed immunologici, la riproduzione, la fisiopatologia cardiovascolare e il mantenimento della funzione respiratoria.^{163,164} Per quanto concerne la riproduzione, è stato dimostrato che il deficit congenito di leptina si associa ad ipogonadismo ipogonadotropo e ad infertilità e che tale deficit può essere contrastato mediante la somministrazione di leptina endogena.¹⁶⁵

In ambito oncologico, numerosi studi recenti hanno indicato che la leptina e il suo recettore, OB-R, sono sovraespressi in diverse neoplasie solide tra cui carcinoma della mammella, carcinoma prostatico e melanoma e risultano coinvolti nella crescita tumorale, stimolando la proliferazione cellulare e l'angiogenesi tumorale.^{166,167}

Adiponectina

L'adiponectina, nota anche con la denominazione Acrp30, apM1, adipoQ e GBP28 è una proteina di 30 kD e composta da 247 amminoacidi, la cui presenza nel tessuto adiposo è stata descritta nel 1995.^{168,169} L'adiponectina è prodotta principalmente dagli adipociti, ma è sintetizzata anche da altri citotipi comprendenti il muscolo scheletrico, i miociti cardiaci e le cellule muscolari.¹⁷⁰⁻¹⁷² Strutturalmente appartiene alla superfamiglia del collagene e si presenta in tre forme oligomeriche maggiori: un trimero a basso peso molecolare, un esamero con peso molecolare medio e un 12-18-mero ad alto peso molecolare. Sono stati identificati due recettori

per l'adiponectina, AdipoR1 ed AdipoR2 che sono prevalentemente espressi nel muscolo e nel fegato.¹⁷³ In condizioni fisiologiche l'adiponectina è presente nel sangue a concentrazioni elevate (5-10 µg/ml); mentre nei soggetti obesi, in quelli con diabete mellito di tipo 2 e in quelli affetti da malattie cardiovascolari i livelli circolanti di adiponectina sono ridotti. Al contrario, la perdita di peso determina un significativo aumento della produzione di adiponectina.¹⁷⁴ Numerosi studi hanno dimostrato che l'adiponectina potrebbe essere una adipochina insulino-sensibilizzante inibendo la gluconeogenesi nel fegato e stimolando l'ossidazione degli acidi grassi liberi nel muscolo scheletrico e nel fegato.^{173,175} L'adiponectina ha inoltre un effetto diretto sull'uptake di glucosio nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo, migliorando la sensibilità all'insulina. I livelli plasmatici di adiponectina, oltre che nell'obesità addominale, sono ridotti nel sesso maschile e nella donna in postmenopausa, nell'ipertensione arteriosa, nell'ipertrigliceridemia, nel diabete di tipo 2 e nella cardiopatia ischemica. I soggetti con elevati livelli plasmatici di adiponectina hanno un rischio significativamente ridotto di eventi cardiovascolari maggiori.¹⁷⁶⁻¹⁷⁹

Oltre al suo ruolo cardine nella regolazione dell'omeostasi metabolica, l'adiponectina esplica un'importante attività antinfiammatoria, migliorando la vasodilatazione endotelio-dipendente, riducendo l'espressione delle molecole di adesione, contrastando l'attività del TNF- α e delle lipoproteine a bassa densità ossidate sulla funzione endoteliale ed inibendo l'attività delle metalloproteasi di matrice. Questo spiega il crescente interesse in letteratura per il ruolo della molecola nell'omeostasi tumorale. È stato infatti dimostrato che i livelli sierici di adiponectina sono inversamente correlati al rischio di sviluppo di neoplasie associate all'obesità come il tumore del colon-retto, del rene, dell'ovaio, dell'endometrio uterino e della mammella in postmenopausa e più recentemente con il melanoma cutaneo e melanoma uveale.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹

Studi sperimentali hanno anche dimostrato che l'adiponectina può esercitare effetti anticancerogeni sia legando direttamente i recettori dell'adiponectina alle cellule tumorali e limitando la proliferazione cellulare, sia indirettamente migliorando la sensibilità all'insulina e riducendo l'infiammazione nei tessuti colpiti. Inoltre, il gene Adipoq che codifica l'adiponectina umana (NCBI Gene ID: 9370) si trova sul cromosoma 3q27.3, un locus che è già stato collegato al diabete di tipo 2 e alla sindrome metabolica.^{20,23,24} Inoltre, il recettore gamma attivato dal proliferatore del perossisoma nucleare (PPARG, Gene ID: 5468), che promuove l'espressione e la secrezione di adiponectina, e la proteina adattatore APPL1 (Gene ID: 26060), che interagisce direttamente con i recettori dell'adiponectina, sono anche codificate dai geni sul cromosoma 3p25.2 e 3p14.3, rispettivamente. Recentemente è stato osservato in colture cellulari di melanoma uveale con monosomia-3 un'immunoreattività inferiore per adiponectina e AdipoR1,

con aumentato rischio di sviluppo di metastasi a distanza. L'adiponectina nelle colture di melanoma uveale dove espressa ha inoltre dimostrato la sua proprietà anti tumorale, mediante il riscontro di un calo significativo dei livelli di ATP, dell'espressione di Ki-67, delle cellule nella fase G2 / M e dell'integrità nucleolare nelle cellule colturali di melanoma.^{180,181}

Resistina

La resistina (FIZZ3), è una adipochina composta da 114 amminoacidi, scoperta nel 2000 da tre gruppi indipendenti.^{182,183} Svolge un ruolo cruciale nel meccanismo di insulino-resistenza ed è coinvolta nella regolazione dei processi infiammatori. Appartiene a una famiglia di proteine ricche di isteina, note anche come molecole resistina-like (RELMs) e si trova in circolo in due forme distinte: un esamero ad alto peso molecolare molto diffuso e un complesso a basso peso molecolare più bioattivo ma meno diffuso.¹⁸⁴ La resistina è sintetizzata prevalentemente dal tessuto adiposo, l'ipotalamo, le ghiandole surrenali, la milza, il muscolo scheletrico, il pancreas e il tratto gastrointestinale, sia nei topi che nell'uomo.¹⁸⁵ I livelli di espressione del gene codificante per la resistina sembrerebbero più elevati nelle cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) che negli adipociti. Nelle cellule mononucleate di sangue periferico, l'espressione e la secrezione della resistina è indotta dall'attività di molteplici citochine pro-infiammatorie quali IL-1, IL-6 e TNF; al contrario, interferone gamma (IFN γ) e leptina non hanno alcun effetto sulla sintesi di resistina.¹⁸⁶ Allo stesso modo, la stimolazione di macrofagi umani con lipopolisaccaridi (LPS) è responsabile di un'aumentata espressione del mRNA della resistina, e la somministrazione di LPS negli esseri umani determina un notevole aumento dei livelli di resistina nel siero.¹⁸⁷ L'induzione della sintesi di resistina può essere attenuata dagli agonisti di PPAR γ è stato infatti dimostrato che il trattamento di pazienti con diabete mellito di tipo 2 con pioglitazone, un agonista PPAR γ , determina una diminuzione dei livelli sierici di resistina.^{185,187,188} Inoltre, diversi fattori, quali ormoni ipofisari, steroidei e tiroidei, l'adrenalina, l'attivazione del recettore β 3-adrenergico, l'endotelina-1 e l'insulina modulano l'espressione della resistina.^{185,187} E' stato, osservato che la resistina, negli esseri umani, presenta molte caratteristiche tipiche delle citochine infiammatorie e quindi è ormai consolidato il suo ruolo nelle malattie infiammatorie associate o meno a insulino-resistenza.^{188,189}

Sebbene il coinvolgimento della resistina nelle neoplasie solide in particolare nel carcinoma del seno e della prostata sia stato ampiamente studiato, il suo ruolo nello sviluppo del melanoma è stato scarsamente indagato. La resistina, similmente alla leptina, oltre a stimolare la proliferazione delle cellule neoplastiche nel melanoma è anche coinvolta nella compromissione

dell'efficacia terapeutica alla dacarbazina. L'esatto meccanismo non è stato delucidato con chiarezza; sembrerebbe che la resistina sia implicata, mediante l'attivazione della via Akt di segnale, della overespressione della proteina FASN (i cui livelli risultano aumentati nel melanoma) coinvolta nella sintesi degli acidi grassi della membrana plasmatica delle cellule neoplastiche e quindi responsabile della loro rapida crescita e proliferazione.¹⁹⁰

Visfatina

La visfatina nota anche come *pre-B-cell colony-enhancing factor* (PBEF), or *nicotinamide phosphoribosyltransferase* (NAMPT) è stata identificata come una adipochina, secreta dagli adipociti del grasso viscerale e come fattore di crescita delle colonie di cellule pre-B (PBEF) essendo coinvolta nei processi di modulazione della flogosi e della sepsi, mediante l'inibizione dell'apoptosi dei neutrofili.^{191,192}

In particolare NAMPT regola la differenziazione, la polarizzazione e la migrazione di monociti/macrofagi, inducendo una down-regulation delle espressioni di TNF-alpha e IL-6. Non solo i macrofagi ma anche i linfociti T subiscono una massiccia deplezione del NAD dopo l'inibizione del NAMPT e, di conseguenza, una ridotta proliferazione, una ridotta produzione di IFN gamma e TNF alpha e, infine, la morte delle cellule autofagiche.¹⁹³

NAMPT catalizza inoltre la sintesi della nicotinamide mononucleotide (NMN) dalla nicotinamide (NAM) e dal PRPP (in presenza di ATP). NAMPT è implicato nella reazione che consente di utilizzare la nicotinamide liberata dagli enzimi che può essere riutilizzata in un percorso noto come percorso di salvataggio, e questo diventa il modo predominante per mantenere i livelli di NAD in molte cellule, soprattutto nelle cellule tumorali che costantemente devono reintegrare il loro pool di NAD. NAMPT, interagendo con il recettore dell'insulina, mediante l'attivazione dei pathway NF-kB, STAT3 e *CCAAT/enhancer-binding protein* (C/EBP) agisce stimolando la secrezione ed il rilascio di chemochine quali CXCL8 e CXCL10 e di peptidi antimicrobici and antimicrobial peptides (catelicidine, hBD2, hBD3) implicati nei processi di tumorigenesi. I livelli sierici di NAMPT risultano elevati in numerose neoplasie e correlati alla prognosi.¹⁹⁴⁻¹⁹⁷ La letteratura sostiene fortemente un razionale per l'impiego degli inibitori di NAMPT sia nell'ambito delle malattie infiammatorie croniche che in ambito oncologico. È probabile che questo ruolo non coinvolga l'attività enzimatica della proteina, sebbene questa sia ancora una questione controversa.^{198,199}

Citochine proinfiammatorie: Tumor Necrosis Factor α e Interleukin-6

Gli adipociti sono in grado di secernere citochine infiammatorie la cui produzione aumenta in caso di eccessivo accumulo di tessuto adiposo; tale aumento sembra essere coinvolto nell'insulino-resistenza correlata all'obesità. Infatti, l'aumento delle dimensioni degli adipociti, tipico dell'obesità determina, negli adipociti e nel tessuto adiposo, uno stato di infiammazione cronica con una diminuzione della secrezione di adiponectina e un aumento della secrezione delle citochine proflogistiche, come IL-6, TNF α e MCP-1. E' stato da tempo dimostrato che il tessuto adiposo è un'importante fonte di IL-6 e che i suoi livelli circolanti sono correlati con l'indice di massa corporea (BMI) e con la dimensione degli adipociti.^{200,201} TNF α e IL-6 sono noti per promuovere la lipolisi e la secrezione di acidi grassi liberi, che contribuiscono a un aumento della produzione epatica di glucosio e all'insulino-resistenza quando i loro livelli sono elevati.²⁰² A differenza dell'IL-6, il TNF α non è secreto solo dagli adipociti, ma principalmente dai macrofagi presenti nel tessuto adiposo, e funziona come un fattore paracrino e/o autocrino.^{203,204} Nel tessuto adiposo ci sono due tipi di macrofagi: i macrofagi residenti/tissutali e i macrofagi infiammatori. I macrofagi residenti hanno bassi livelli di produzione di citochine proinfiammatorie, ma possono essere attivati in seguito a un maggiore reclutamento e a una maggiore attivazione dei monociti del sangue.²⁰⁵ L'infiltrazione dei monociti/macrofagi nel tessuto adiposo inizia, probabilmente, con l'aumento delle dimensioni degli adipociti, che è associato ad un aumento dello stress fisico e della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), e con una maggiore secrezione di acidi grassi liberi e di citochine infiammatorie.^{206,207} Di queste citochine, MCP-1, secreta dai macrofagi e dagli adipociti stessi, sembra essere la più importante ed ha la funzione, insieme alle altre citochine, di reclutare, una volta rilasciate in circolo, i monociti attivati nel tessuto adiposo.^{205,208} E' stato ipotizzato che, una volta nel tessuto adiposo, i monociti differenziano in macrofagi infiammatori rilasciando il TNF α , che induce ulteriormente l'infiammazione negli adipociti e il reclutamento dei macrofagi, determinando così un circolo vizioso. Nei soggetti gravemente obesi, il numero dei macrofagi è più alto nel grasso viscerale che nel grasso sottocutaneo e questo è coerente con il fatto che il grasso viscerale svolge un ruolo più importante nell'insulino-resistenza.^{209,211}

Il TNF- α è una citochina secreta da molteplici cellule del sistema immunitario tra cui i macrofagi attivati, nel tessuto adiposo e nel tessuto muscolare scheletrico. Si tratta di una proteina transmembrana di 26-kDa che viene tagliata in una proteina biologicamente attiva di 17-kDa, la quale esplica le sue funzioni interagendo con due tipi di recettori, il recettore di tipo 1 (TNFR-1) e il recettore di tipo 2 (TNFR-2).^{212,213} Il TNF- α è stato il primo prodotto secreto dal tessuto

adiposo ad essere proposto nel rappresentare un legame molecolare tra obesità e insulino-resistenza.²¹⁴ In particolare, il TNF- α è in grado di inibire il differenziamento degli adipociti riducendo l'espressione di fattori di trascrizione PPAR- γ e CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBP α); inoltre, può indurre un'alterazione del metabolismo glucidico e lipidico mediante la soppressione dell'espressione di geni specifici per gli adipociti, quali LPL, il glicerol-3-fosfatodeidrogenasi, il trasportatore di glucosio GLUT-4 e AP2.²¹⁵

L'IL-6 è una citochina coinvolta principalmente nella fase acuta della risposta infiammatoria e secreta in particolare dai macrofagi attivati e dai linfociti. Il tessuto adiposo è responsabile della produzione di oltre un terzo della IL-6 circolante che risulta maggiormente espressa nel tessuto adiposo viscerale e in misura minore in quello sottocutaneo.²¹⁶ Gli stessi ricercatori hanno anche proposto che l'IL-6, attraverso l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, potrebbe provocare i sintomi caratteristici della sindrome metabolica.²¹⁷ Infatti, tale citochina incrementa la secrezione di CRH, la produzione di ormone adrenocorticotropo (ACTH) e di cortisolo predisponendo gli individui all'obesità centrale, all'insulino-resistenza e alla dislipidemia.²¹⁸

Entrambe le citochine sovramenzionate oltre ad avere un ruolo di primo piano della risposta infiammatoria, sono unitamente alle metalloproteasi (MMP), Le analisi dei profili di espressione trascrittomiche in vitro hanno indicato il TNF α , la MMP-2 e l'IL-6 come i regolatori a monte più significativi della progressione del melanoma e come modulatori chiave dell'aggressività della neoplasia. Diverse vie sono risultate particolarmente coinvolte nel fenotipo aggressivo delle cellule come la segnalazione del recettore degli idrocarburi arilici; OX40 Signaling Pathway, Antigen Presentation Pathway, Estrogen-mediated S-phase Entry, Cell Cycle, G1 / S Checkpoint Regulation, Vitamina D e seleno-proteine, conosciute come potenzialmente importanti nello sviluppo e nella progressione del tumore. Le analisi di annotazione funzionale hanno rivelato una forte implicazione nei tratti di aggressività delle modifiche post-trascrizionali, del trasporto molecolare e delle reti di traffico proteico e delle vie di segnalazione delle citochine sopra riportate. In particolare un recente studio ha dimostrato una secrezione aumentata di TNF- α (incremento di oltre 20 volte) da parte delle linee cellulari di melanoma caratterizzata da maggiore aggressività. Si ritiene che il TNF sia coinvolto nel potenziamento dell'invasione tumorale parzialmente mediante la sovraregolazione dell'espressione delle metalloproteasi della matrice quindi i bassi livelli di trascrizione di TIMP accoppiati all'aumentata attività enzimatica della MMP2 nelle cellule più aggressive, potrebbe essere una conseguenza diretta dell'azione del TNF. L'ipotesi che il TNF- α possa essere un fattore cruciale intrinseco nella crescita del melanoma e nell'aggressività è stata ulteriormente testata inibendo la secrezione di TNF attraverso un anticorpo monoclonale chimerico (INFLIXIMAB-IFX). Dopo il trattamento con

IFX, il tasso di proliferazione è stato significativamente ridotto in 3 su 4 linee cellulari di melanoma umano; la linea cellulare A375 altamente aggressiva in particolare ha mostrato una marcata riduzione della sua capacità di proliferazione, di migrazione e di invasione. Diversi dati in letteratura attestano che diversi MMP, vale a dire MMP-9, MMP-12, MMP-2, MMP-14 e MMP-19, svolgono un ruolo nell'aggressività del melanoma e di conseguenza possono rappresentare utili biomarcatori prognostici.²¹⁹⁻²²² Recenti studi sul ruolo delle vie TNF-dipendenti nella crescita delle cellule di melanoma sembrano suggerire l'esistenza di una cooperazione tra l'attività enzimatica di MMP-2 e la secrezione di TNF per definire il fenotipo aggressivo delle cellule di melanoma, Il ruolo controverso del TNF, che sembrerebbe inibire o al contrario promuovere la crescita tumorale, potrebbe essere spiegato dalla capacità delle cellule tumorali di attrarre cellule che secernono TNF attraverso l'espressione di molecole MHC di classe II.²⁰²

Attivatore del plasminogeno

L'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) noto anche come SERPINE-1, inibisce la produzione di plasmina e ostacola gli eventi da essa mediati come fibrinolisi e degradazione della matrice extracellulare; elevati livelli plasmatici di PAI-1 sono da tempo un fattore riconosciuto di rischio trombotico.²²³ Sebbene il PAI-1 sia sintetizzato da vari stipiti cellulari, nell'obeso il tessuto adiposo è la maggiore sorgente di PAI-1 e i livelli circolanti di PAI-1 correlano con il grado di obesità addominale.^{223,224} A sua volta, PAI-1 sembra avere un ruolo nello sviluppo del tessuto adiposo; l'animale con deficit di PAI-1 ha una spesa energetica aumentata, è resistente all'obesità indotta da eccesso calorico, mostra di avere adipociti più piccoli, bassi livelli tissutali di trigliceridi e una migliore sensibilità all'insulina rispetto all'animale di controllo.^{225,226}

Fattori di crescita dell'endotelio vascolare

I VEGF sono ampiamente distribuiti tra i vari tessuti ed espressi ad alti livelli nel tessuto adiposo bruno come fattore di crescita dell'endotelio vascolare A (VEGFA) e fattore di crescita dell'endotelio vascolare B (VEGFB).^{227,228}

Il VEGFA derivato dal tessuto adiposo bruno oltre che regolare e mediare lo stress acuto da freddo, ha molte funzioni endocrine e paracrine, in quanto stimola direttamente la proliferazione dei progenitori degli adipociti e delle circostanti cellule endoteliali vascolari. (Bajaki) I topi

transgenici fat-specific VEGFA sono protetti da obesità indotta dalla dieta e da disturbi metabolici come risultato di effetti pleiotropici indotti dai segnali del VEGF, inclusa la stimolazione dell'angiogenesi, la termogenesi del tessuto adiposo bruno e la modulazione della polarizzazione dei macrofagi.^{228,229}

La sovraespressione del VEGFA nel tessuto adiposo bruno aumenta la termogenesi nei topi solamente durante l'esposizione cronica al freddo, ed in parte migliora la disfunzione metabolica associata con obesità indotta dalla dieta. Tuttavia, i livelli plasmatici di VEGFA rimangono invariati nei topi transgenici, il che suggerisce, che il contributo di VEGFA sistemico da parte del tessuto adiposo bruno sia molto modesto.^{229,230} Similmente al VEGFA, il VEGFB esercita effetti locali sui tessuti adiposi, stimolando in parte la proliferazione delle cellule endoteliali e l'assorbimento degli acidi grassi.²³⁰

L'angiogenesi espleta un ruolo cardine nella crescita della massa tumorale e nella capacità metastatica della neoplasia. L'espressione di VEGFA risulta infatti elevata sia a livello plasmatico che a livello tissutale in pazienti affetti da tumori solidi incluso il melanoma, nella quale l'espressione sembra correlare positivamente sia con lo spessore di Breslow sia con la presenza di metastasi.²³¹⁻²³³

Fattori di crescita insulino-simili

I fattori di crescita insulino-simili (IGFs) tra i quali in particolare spicca IGF-1 ed il suo recettore IGF-1 (IGF-1R), sono stati inizialmente identificati come fattori inducenti ipoglicemia e da qui il loro nome “insulino-simili”; successivamente è stata dimostrata la loro capacità di stimolare la crescita cellulare e sono stati quindi riconosciuti come “fattori di crescita insulino-simili”.²³⁴ I IGFs sono principalmente prodotti a livello epatico anche se molti altri tessuti sono in grado di sintetizzare sia IGF-1 che IGF-2, incluso il tessuto adiposo. A differenza del GH, che è rilasciato in maniera pulsatile dalle cellule ipofisarie, IGF-1 e IGF-2 sono costitutivamente rilasciati e la loro concentrazione in circolo è regolata dalle proteine di trasporto (IGFBPs). Questo consente una concentrazione ematica a livello costante, che è superiore dalle 100 alle 1000 volte a quella dell'insulina.^{234,235}

IGF-1 ha un ruolo importante nella crescita somatica post-natale mentre IGF-2 è indispensabile per la crescita somatica pre-natale. Le fisiologiche funzioni di IGF-2 dopo la nascita sono tutt'oggi ancora sconosciute. Tuttavia è noto che nella vita adulta i livelli circolanti di IGF-2 sono circa cinque volte maggiori dei livelli circolanti di IGF-1. IR e IGF-1R sono recettori

tirosin-chinasici transmembrana e mediano le funzioni cellulari dei ligandi, mentre IGF-2R è un recettore mannosio-6-fosfato e non è ben chiara la sua attività enzimatica. IR ha una elevata affinità per l'insulina mentre per i IGFs risulta significativamente minore. Al contrario IGF-1R lega con un elevata affinità IGFs e con una minore affinità l'insulina. Una volta avvenuto il legame ligando-recettore la risposta iniziale è data dall'autofosforilazione del residuo tirosinico che innesca l'attività tirosin chinasica del recettore. Entrambi i recettori (IR e IGF-1R) si legano e fosforilano altre proteine cellulari necessarie per la trasduzione del segnale intracellulare. In particolare, comuni substrati proteici come ad esempio i substrati insulino-simili (IRS1-4), una volta attivati innescano le vie del fosfatidil-inositolo-3-idrossi-fosfato (PI3K) e MAP-kinasi (MAPK) che rappresentano importanti cascate di segnale intracellulare che esplicano le funzioni biologiche dei recettori mediando attività quali in particolare la regolazione della captazione di glucosio cellulare e lo stoccaggio del glucosio, delle proteine e dei lipidi ed il loro rilascio da parte del fegato, del tessuto adiposo e del muscolo. Oltre ad essere importanti regolatori della crescita d'organo e corporea, i fattori di crescita insulino-simili hanno anche la funzione di salvaguardare la vitalità cellulare soprattutto in condizioni di stress.^{236,237}

Numerosi studi presenti in letteratura su mammiferi suggeriscono che l'iperglicemia e l'iperinsulinemia siano fattori cruciali nell'invecchiamento. Le molecole di segnalazione di GH / insulina e gli stessi fattori di crescita insulino-simile 1 che sono state collegate alla longevità includono *daf-2* e *InR* e i loro omologhi nei mammiferi, e l'inattivazione dei geni corrispondenti aumenta la durata della vita di nematodi, moscerini della frutta e topi. Gli effetti di prolungamento della restrizione calorica sono probabilmente correlati alla diminuzione dei livelli di IGF-1.^{238,239} La restrizione calorica sembrerebbe quindi associata non solo ad un ridotto rischio di diabete e comorbidità metaboliche ma anche e soprattutto ad un ridotto rischio di insorgenza di tumori solidi. È emerso inoltre che i farmaci antidiabetici sono candidati promettenti sia per l'estensione della durata della vita che per la prevenzione dell'insorgenza di tumori. I farmaci antidiabetici sembrano infatti posticipare la cancerogenesi spontanea nei topi e nei ratti, così come la cancerogenesi chimica e da radiazioni in topi, ratti e criceti. Inoltre, la metformina sembra diminuire il rischio di neoplasie nei pazienti diabetici. In tutte le funzioni sopra indicate un ruolo centrale sembra essere svolto proprio dall'IGF-1.^{236,240,241}

Chemochine

Le chemochine (dal greco *-kinos*, movimento) sono una famiglia di piccole proteine secrete dalle cellule aventi una dimensione compresa tra 8-10 Kd e contenenti un residuo di cisteina

essenziale per la loro caratteristica forma tridimensionale. Il loro nome deriva dalla capacità di indurre la chemiotassi cellulare, regolando il processo di migrazione delle cellule responsive. Si distinguono 4 classi di chemochine:

- Le C chemochine hanno un solo gruppo di cisteina nella loro struttura.
- Le CC chemochine hanno due gruppi di cisteina e comprendono 27 membri (CCL1-CCL27).
- Le CXC chemochine hanno due gruppi di cisteina separati da un aminoacido, sono 17 e sono divise a loro volta in due categorie: quelle con una specifica sequenza di aminoacidi (detto motif) acido glutamico-leucina-arginina (o ELR) immediatamente prima della prima cisteina del CXC motif (denominate ELR-positive), e quelle senza l'ELR motif (denominate ELR-negative).
- Le CX3C chemochine, sono formate da 3 aminoacidi tra le due cisteine e l'unica fino ad ora studiata e stata chiamata fractalkine (o CX3CL1)^{242,243}

Le principali chemochine angiogeniche sono CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 e CXCL8. Nel topo, tutte le chemochine ELR + CXC segnalano tramite CXCR2, mentre negli esseri umani, i ligandi delle chemochine ELR + CXC possono interagire con tramite entrambi CXCR2 e CXCR1.^{244,245} Le chemochine CXC ELR, quali CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 e CXCL8 possono promuovere direttamente la migrazione e la proliferazione delle cellule endoteliali e, infine, la neovascolarizzazione, interagendo principalmente con CXCR2 ma non con CXCR1.²⁴⁶ La neovascolarizzazione è cruciale per la riparazione dei tessuti alle risposte infiammatorie e per la crescita del tumore.^{246,247}

Le chemochine hanno un impatto infatti diretto sulle cellule tumorali. La senescenza indotta da oncogeni (OIS) funge da potente barriera contro la trasformazione oncogenica sopprimendo la proliferazione non programmata delle cellule neoplastiche precoci. Le cellule sottoposte a OIS secernono chemochine leganti CXCR2 e IL-6 attraverso l'attivazione di due fattori di trascrizione pro-infiammatori, C / EBP- β e NF- κ B. Le chemochine secrete leganti CXCR2 possono promuovere l'arresto della crescita cellulare e ritardare la fase iniziale della tumorigenesi. Al contrario, l'espressione genica pro-tumorigenica e la proliferazione nelle cellule tumorali possono essere favorite da varie chemochine tra cui CXCL8, CXCL12, CXCL16, CCL19, CCL20, CCL21, CCL27 e CCL28. Inoltre, CXCL8 e CXCL12 hanno un ruolo importante nella transizione epiteliale-mesenchimale (EMT), un passaggio cruciale per l'invasione del tumore e la formazione di metastasi. Pertanto le chemochine possono accelerare il processo di

metastatizzazione promuovendo la proliferazione delle cellule neoplastiche o prevenendo la morte delle cellule tumorali. Questi risultati suggeriscono collettivamente che le chemochine possono prevenire la tumorigenesi nella fase iniziale inducendo la senescenza cellulare e possono anche promuovere l'invasione e le metastasi nella fase successiva migliorando la motilità e la sopravvivenza delle cellule tumorali.^{258,249}

STUDIO SPERIMENTALE

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Oggetto dello studio è stata la ricerca dell'espressione di adipocitochine nel tessuto sottocutaneo perilesionale nei pazienti affetti da melanoma cutaneo afferenti alla Clinica Dermatologica dell'Ospedale Riuniti di Ancona e al reparto di Dermatologia dell'Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico IRCCS di Ancona, con la valutazione del ruolo degli stessi nell'espressione di malattia. Scopo secondario dello studio è stato quello di valutare l'impatto prognostico delle suddette esaminando la loro relazione con la severità di malattia e con i principali aspetti istopatologici della stessa.

Lo studio è stato strutturato nelle seguenti fasi:

1. Identificazione delle adipocitochine e citochine da indagare sulla base di una approfondita analisi della letteratura scientifica esistente,
2. Arruolamento sequenziale dei pazienti con diagnosi di melanoma, secondo partecipazione volontaria, con creazione di database mediante raccolta dei referti anatomico-patologici delle lesioni primitive asportate presso la Clinica di Dermatologia dell'Università Politecnica delle Marche dell'Ospedale Regionale di Ancona e inserimento nello stesso della sede di lesione, caratteristiche istologiche e dati relative le peculiarità demografiche della popolazione quali età, sesso, body mass index (BMI), abitudine tabagica, comorbidità e terapie farmacologiche in atto.
3. Arruolamento sequenziale dei controlli sani includenti pazienti con diagnosi di neoformazioni melanocitarie benigne e cisti epidermoidi, in base a partecipazione volontaria e creazione di database associato includente le caratteristiche istologiche e le caratteristiche demografiche della popolazione
4. Ricerca di espressione delle seguenti adipocitochine
 - Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-alpha)
 - Interleukin-6 (IL-6)
 - Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI1),

- Leptin (LEP)
- Insulin-like Growth factor 1 (IGF1)
- Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A)
- Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)
- C-X-C Motif Chemokine Ligand 1 (CXCL1)
- C-X-C Motif Chemokine Ligand 8 (CXCL8)

su campioni di tessuto sottocutaneo perilesionale congelato prelevati da entrambe le popolazioni (popolazione con melanoma e controlli) prese in esame.

5. Stratificazione dei soggetti analizzati in base alle caratteristiche istologiche della neoplasia.
6. Confronto della espressione dei markers selezionati nella popolazione dei pazienti affetti da melanoma e nei 2 gruppi controllo.
7. Confronto tra espressione dei markers selezionati con i principali fattori prognostici di malattia.
8. Analisi statistica dei dati.

L'identificazione dell'espressione dei suddetti markers contribuirebbe ad approfondire la conoscenza sulla patogenesi ed i meccanismi molecolari del melanoma e a migliorare gli attuali modelli di stima del rischio di malattia e di progressione della stessa, attualmente basati rispettivamente sulle caratteristiche anamnestiche e fenotipiche del soggetto e su quelle istologiche della neoplasia.

La caratterizzazione del profilo infiammatorio e citochinico del tessuto adiposo sottocutaneo potrebbe concorrere all'apertura di nuovi scenari per future terapie a bersaglio molecolare.

MATERIALI E METODI

Selezione dei partecipanti allo studio

Hanno preso parte allo studio pazienti con diagnosi clinica poi confermata istologicamente di melanoma cutaneo, giunti all'osservazione della Clinica di Dermatologia, Ospedali Riuniti di Ancona nel periodo compreso tra il gennaio 2019 ed ottobre 2020 e sottoposti in tale periodo a diagnosi e biopsia escissionale della lesione o sottoposti a follow-up dermatologico in seguito a pregressa diagnosi di melanoma cutaneo. L'escissione semplice e l'analisi anatomo-patologica del tumore primitivo sono state eseguite nel periodo da Gennaio 2019 a Ottobre 2020. Gli esami anatomo-patologici sono stati eseguiti presso l'Istituto di Anatomia Patologica dell'Ospedale Regionale di Ancona. Lo studio di espressione dei markers selezionati è stato effettuato dall'istituto di Anatomia Umana dell'Università Politecnica delle Marche. Nella fase preliminare a tutti i pazienti è stato richiesto il consenso informato per la realizzazione dello studio in oggetto. I controlli sani sono stati reclutati in base a partecipazione volontaria.

Sono stati esclusi dallo studio pazienti con abitudine tabagica, comorbidità tali da poter alterare il profilo adipocitochinico tra le quali le comorbidità metaboliche maggiori (diabete mellito, ipercolesterolemia, ipertrigliceridemia), malattie autoimmunitarie, malattie sistemiche maggiori (infarto acuto del miocardio, scompenso cardiaco, insufficienza renale terminale), malattie cutanee infiammatorie immunomediate (psoriasi, idrosadenite suppurativa), o che assumevano farmaci capaci anch'essi di modificare potenzialmente il profilo adipocitochinico (farmaci per patologie metaboliche e farmaci biologici) e donne in stato di gravidanza. Nell'ambito dello studio sono stati arruolati 24 pazienti e 22 controlli sani (11 pazienti con neoformazione melanocitaria benigna e 11 pazienti con cisti epidermoide).

Raccolta dei dati

Per ogni paziente sia del gruppo melanoma che dei gruppi controlli sono state annotate le seguenti caratteristiche demografiche:

- Sesso
- Età alla diagnosi
- Peso

- Altezza
- Calcolo del body mass index (BMI)
- Eventuali comorbidità

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

- Spessore di Breslow,
- Livello di invasione di Clark,
- Indice mitotico (numero di mitosi x mm², o in alcuni casi, x 10hpf),
- Tipo istologico,
- Presenza di ulcerazione,
- Presenza di invasione linfo-vascolare,
- Presenza di neurotropismo,
- Presenza di microsatellitosi,
- Presenza di regressione,
- Tipo di infiltrato infiammatorio (classificato come “brisk, non brisk“ o “assente“, oppure come intralesionale, perilesionale, sotto lesionale, focale, diffuso, intenso, scarso o assente),
- Pattern di crescita,
- Positività o negatività dei margini chirurgici.

Per ciascun paziente è stata anche annotata la sede di insorgenza del melanoma cutaneo e raccolta la documentazione istologica riguardante il successivo allargamento con l’eventuale esecuzione della metodica del linfonodo sentinella. Sono stati raccolti i referti istologici riguardanti le eventuali dissezioni linfonodali ed i dati riguardanti localizzazioni secondarie cutanee e non, inclusi i referti istologici di eventuali metastasectomie cutanee.

Per i pazienti con diagnosi di nevo melanocitario è stato inoltre appuntato le caratteristiche istologiche tra le quali tipo di nevo (lentiginoso, dermico) e grado di atipia (lieve, moderato, severo).

Estrazione del DNA genomico

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

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

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

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

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

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

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

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

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

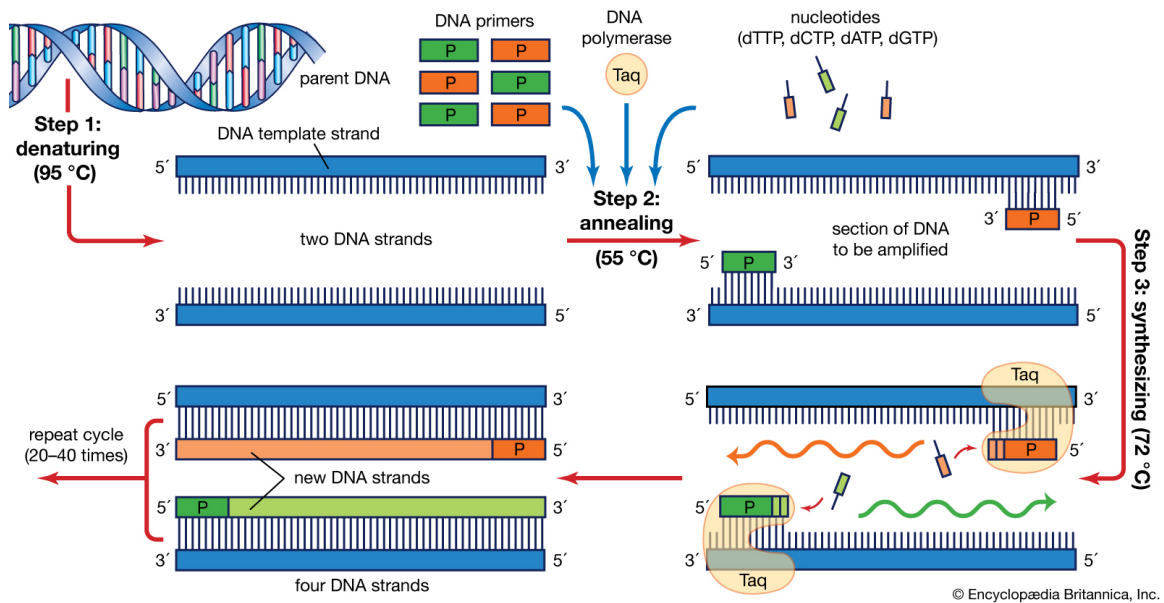


Figura 13. Schematizzazione del meccanismo di PCR

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

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

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

L'RNA totale è stato estratto con il reagente *Trizol* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), purificato, digerito con ribonucleasi desossiribonucleasi e concentrato utilizzando *RNeasy Micro kit* (Qiagen, Milano, Italia) secondo le istruzioni del produttore. Per la determinazione dei livelli di mRNA, 1 µg di RNA è stato trascritto con il kit RT cDNA ad alta capacità con RNase Inhibitor (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA) in un volume totale di 20 µl. È stata eseguita la qRT-PCR utilizzando *TaqMan Gene Expression Assays* e *Master Mix TaqMan* (Applied BioSystems). Tutte le sonde (Tabella 1) provenivano da Applied BioSystems. Le reazioni sono state eseguite da Step One Plus Real Sistema Time PCR (Applied BioSystems) utilizzando 50 ng di RNA in formato un volume di reazione finale di 10 µl. La piastra di PCR costituita da 96 pozzetti è stata inserita nel termocycler e sono stati fissati i seguenti parametri termici: incubazione iniziale a 95 ° C per 10 minuti seguita da 40 cicli di 95 ° C per 15 secondi e 60 ° C per 20 secondi. Tutti i campioni sono stati analizzati in duplicato. La proteina TATA box-binding (TBP) è stata utilizzata come controllo endogeno per normalizzare l'espressione genica. Espressione relativa di mRNA è stato determinato con il metodo 1Ct (2^{-1Ct}).

<i>Target gene</i>	<i>Assay ID</i>
TNF-alpha	Hs00174128_m1
IL-6	Hs00174131_m1
PAI1	Hs00167155_m1
LEP	Hs00174877_m1
IGF1	Hs01547656_m1
VEGF-A	Hs00900055_m1
CXCL1	Hs00236937_m1
CXCL8	Hs00174103_m1
NAMPT	Hs00237184_m1
TBP	Hs00427620_m1

Tabella 1. *Taqman probes all from Applied Biosystems*

Analisi statistica dei dati

Per ogni adipocitochina oggetto dello studio si è proceduto con la valutazione dell'espressione in termini di differenza media tra melanomi rispetto ai due gruppi controllo (nevi melanocitari e cisti epidermoidi) separatamente. Si è proceduto inoltre a confrontare tale espressione in relazione ai principali parametri prognostici istologici nel gruppo melanoma (spessore di Breslow, livello di Clark, flogosi, regressione e numero di mitosi). La significatività statistica è stata testata attraverso test t a due code per campioni non appaiati. L'analisi è stata ripetuta anche confrontando i valori di ogni stadio del melanoma (ptis, pt1, pt2-4) rispetto ai due gruppi di controllo. Il livello di significatività statistica è stato settato a $p < 0.05$ (*) e $p < 0.001$ (**). Il software utilizzato per le analisi statistiche è Graphpad Prism 8 per Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

RISULTATI

Caratteristiche demografiche e di malattia dei pazienti

Sono stati arruolati nello studio complessivamente 47 pazienti, 26 di sesso maschile, e 21 di sesso femminile. Il gruppo di pazienti affetti da melanoma risultava essere composto rispettivamente da 14 di sesso maschile e 10 di sesso femminile. L'età media dei soggetti alla diagnosi di melanoma, senza tener conto del sesso, era di 65.6 anni. L'età media nelle donne (62.3 anni) e negli uomini (63.1 anni) risultava essere uniforme. Gli estremi della casistica erano rappresentati da due pazienti di sesso femminile con età alla diagnosi di 94 anni e da una paziente con età di 30 anni al momento della diagnosi.

I pazienti affetti da melanoma presentavano un BMI medio di 25.9 kg/m²; nello specifico 4% dei pazienti risultava sottopeso (BMI 16.5-18.4), 29% normopeso (BMI 18.5-24.9), 54% in sovrappeso (BMI 25-30), 13% presentava obesità di I grado (BMI 30.1-34.9).

Le localizzazioni più comuni di malattia sono risultate essere l'arto inferiore (33% dei casi) con il dorso (33% dei casi), e a seguire il torace anteriore (21% dei casi), l'arto superiore (9%) e l'addome (4%). Nessun melanoma del distretto testa-collo era presente nella nostra casistica.

Per quanto riguarda il sesso maschile, la sede più frequente di lesione è risultata il dorso (43%), seguita da torace anteriore (36%), addome (7%), estremità superiori (7%) ed inferiori (7%); nel sesso femminile è stata rilevata ad una preponderanza delle lesioni localizzate agli arti inferiori (70%), e le restanti localizzate a livello del dorso (20%), ed arto superiore (10%). Questo campione rispecchiava le caratteristiche epidemiologiche già note, come la maggiore presenza delle localizzazioni agli arti nel sesso femminile e la maggiore presenza delle localizzazioni al tronco-torace nel sesso maschile.²²²

Un solo paziente nel nostro database aveva anamnesi personale positiva per melanomi multipli e un nessun paziente aveva familiarità positiva per melanoma.

Per quanto riguarda lo spessore di Breslow, 8 melanomi erano lesioni intraepidermiche o in situ pTis; 11 melanomi erano melanomi sottili (con spessore inferiore ad 1 mm) classificati istologicamente come pT1a, in assenza pertanto di aspetti di ulcerazione. I restanti 5 melanomi erano melanomi spessi suddivisi rispettivamente in 2 melanomi con spessore di Breslow intermedio (1,1mm-2,0mm) e classificati istologicamente come pT2a e 3 melanomi con spessore di Breslow > 4mm) e classificati istologicamente come pT4 (1 pT4a, in assenza quindi di ulcerazione e 2 pT4b, in presenza quindi di ulcerazione).

Per quanto riguarda il livello di invasione di Clark, il 4% di livello II, il 42% di livello III, il 21% di livello IV. Escluse le lesioni in situ, il 46% dei melanomi erano istologicamente del tipo a diffusione superficiale (*superficial spreading melanoma*), che quindi si confermava anche nel nostro campione come l'istotipo più frequente. Il melanoma nodulare (*nodular melanoma*) costituiva il 17% delle lesioni. Un solo caso (4%) di melanoma a diffusione superficiale con crescita nodulare è stato documentato.

Per quanto riguarda i parametri prognostici istologici diversi dallo spessore e dal livello di invasione, l'ulcerazione risultava presente in 2 pazienti (8%) corrispondenti allo stadio pT4b. La regressione risultava presente nel 21% dei pazienti, rispettivamente <75% in 4 pazienti (17%) dei pazienti e >75% in 1 paziente (4%).

Inoltre 5 pazienti presentavano una conta mitotica positiva (21%), con un numero medio di mitosi di 11/mm² (valori estremi 2/mm² e 14/mm²).

Il 50% delle lesioni presentava infiltrato infiammatorio documentato istologicamente, mentre il 50% delle lesioni non presentava infiltrato infiammatorio.

Nessun paziente presentava lesioni con invasione linfo-vascolare, neurotropismo, o microsatellitosi.

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

I controlli sani risultavano essere 22 complessivamente in buono stato di salute, arruolati su base volontaria ed in maniera sequenziale durante il periodo di svolgimento dello studio. Tali pazienti risultavano suddivisi in 2 sottogruppi. Il primo sottogruppo dei controlli era composto da 11 pazienti con diagnosi clinica di nevo melanocitario e sottoposti ad exeresi chirurgica dello stesso; il secondo sottogruppo risultava composto da 11 pazienti con diagnosi clinica di cisti epidermoide non flogosata anch'essi sottoposti ad asportazione chirurgica della lesione. Il sottogruppo dei pazienti affetti da nevi melanocitari era composto rispettivamente da 5 di sesso maschile e 6 di sesso femminile, con età media di 52.4 anni. Il sottogruppo dei nevi melanocitari risultava costituito da 5 nevi con atipia lieve e 6 nevo con atipia moderata. Nessuna atipia severa risultava inclusa nel campione analizzato.

Il sottogruppo dei pazienti con cisti epidermoidi era composto rispettivamente da 7 soggetti di sesso maschile e 4 di sesso femminile, con età media pari a 64 anni.

<i>Caratteristiche demografiche</i>	<i>Gruppo pazienti Melanoma</i>	<i>Gruppo controllo Nevi</i>	<i>Gruppo controllo Cisti epidermoidi</i>
Sesso	F 10 M 14	F 6 M 5	F 4 M 7
Età media	65.6	52.4	64
BMI medio	25.9 Kg/m ²	27.0 Kg/m ²	24.3 Kg/m ²
Comorbidità (n) No comorbidità	Depressione 1 Parkinson 1 Neoplasie pregresse 5 Fibromialgia 1 Fibrillazione atriale 1 Pregresso IMA 1	Asma allergico 2 IRC lieve 2 Neoplasie pregresse 1	Asma allergico 1 Parkinson 2 Tiroidite di Hashimoto 1 Neoplasie pregresse 1

Tabella 2. Caratteristiche della popolazione oggetto dello studio: pazienti affetti da melanoma, controlli nevi melanocitari e controlli cisti epidermoidi

<i>Caratteristiche istopatologiche dei melanomi</i>	<i>Gruppo pazienti Melanoma</i>
Sede di lesione	Dorso 8 Torace 5 Addome 1 Arto inferiore 8 Arto superiore 2
Variante istologica	Intrepidermico 8 A Diffusione Superficiale 11 Nodulare 4 A diffusione superficiale con crescita nodulare 1
Stadiazione patologica TNM (pT)	pTis 8 pT1a 11 pT1b 0 pT2a 2 pT2b 0 pT3a 0 pT3b 0 pT4a 1 pT4b 2
Spessore di Breslow	0-1 mm 11 0-2 mm 1 > 2 mm 3
Livello di Clark	Assente 8 I 0 II 1 III 11 IV 5
Ulcerazione	No 22 Si 2
Mitosi	No 18 Si 6
Regressione	No 19 Si 5 (<75% 4 e >75% 1)
Infiltrato infiammatorio	No 12 Si 12
Infiltrazione vascolare	No 24 Si 0
Infiltrazione neurale	No 24 Si 0

Tabella 3. Caratteristiche istopatologiche dei melanomi cutanei

Risultati dell'espressione molecolare

TNF alpha

Per il TNF alpha è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nell'espressione di mRNA nel tessuto adiposo sottocutaneo tra il gruppo melanoma ($p < 0.05$) e nevi melanocitari e gruppo melanoma e cisti epidermoide ($p < 0.01$).

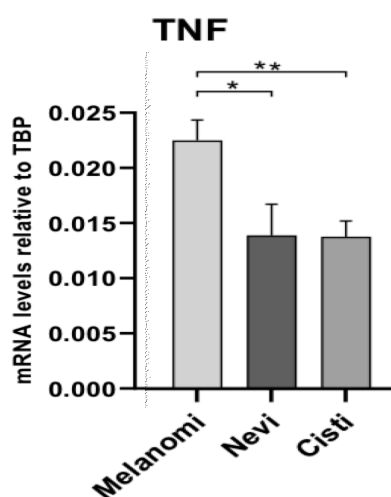


Figura 14. Rappresentazione grafica dell'espressione di mRNA del TNF alpha nei melanomi e nei gruppi controllo rispetto a TBP

Per quanto concerne la stratificazione dei risultati in relazione allo stadio patologico di malattia si è riscontrata una differenza statisticamente significativa dell'espressione di mRNA di TNF alpha nel tessuto sottocutaneo nei melanomi spessi (pT2-pT4) rispetto ad entrambi i gruppi controllo nevi melanocitari ($p < 0.05$) e cisti epidermoidi ($p < 0.01$).

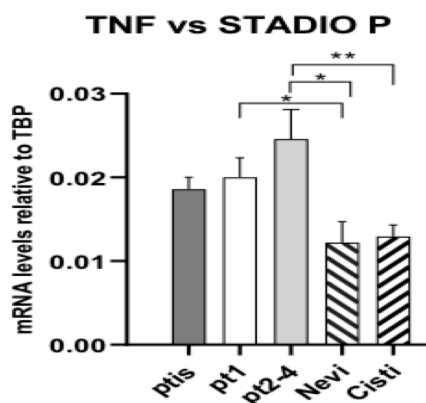


Figura 15. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di TNF alpha in funzione della classificazione pTNM di malattia

Analizzando i risultati dell'espressione dell'mRNA di TNF alpha, assente risulta la significatività statistica in relazione al differente spessore di Breslow delle lesioni esaminate (lesioni in situ, <1 mm e > 1 mm). In relazione al livello di Clark (suddividendo i pazienti con melanoma in 2 gruppi, livello di Clark 0 e livello di Clark compreso tra II e IV), non è stata osservata una differenza ststisticamente significativa nell'espressione di mRNA tra i sottogruppi di melanoma considerati. Altrettanto non riscontrata la significatività statistica dell'espressione dell'mRNA di TNF alpha rispetto a flogosi tumorale (presente/assente) e alla presenza o assenza di mitosi (0 o >1 mm²).

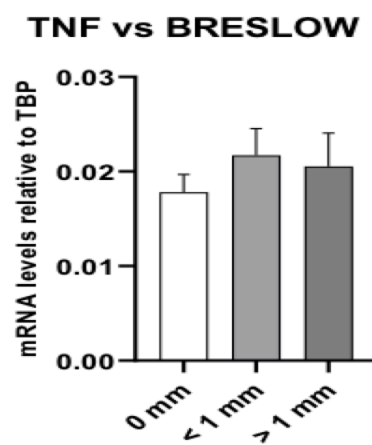


Figura 16. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di TNF alpha in funzione dello spessore di Breslow

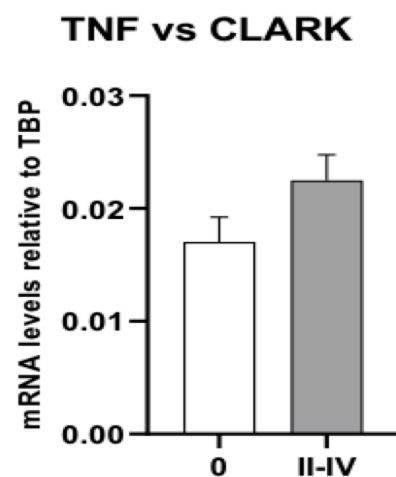


Figura 17. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di TNF alpha in funzione del livello di Clark

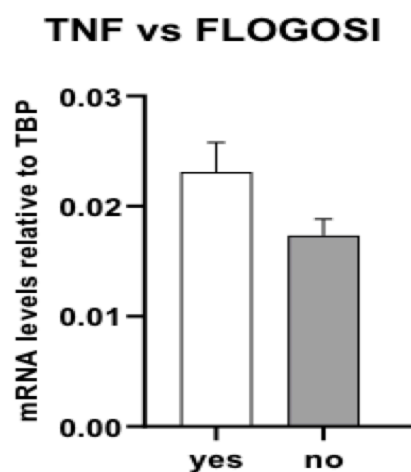


Figura 18. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di TNF alpha in funzione della flogosi lesionale

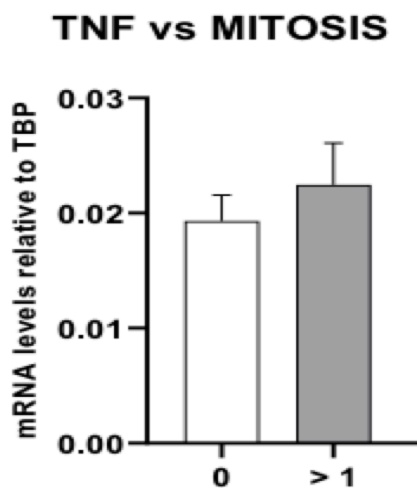


Figura 19. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di TNF alpha in funzione alla presenza o assenza di mitosi

Per quanto riguarda la stratificazione dei risultati in base alla presenza o assenza di regressione all'esame istologico, è stata riscontrata significatività statistica nella espressione di mRNA rispetto a TBP nell'ambito del gruppo di pazienti affetti da melanoma ($p < 0.05$), risultando tale espressione maggiore nei melanomi con assenza di regressione.

TNF vs REGRESSION

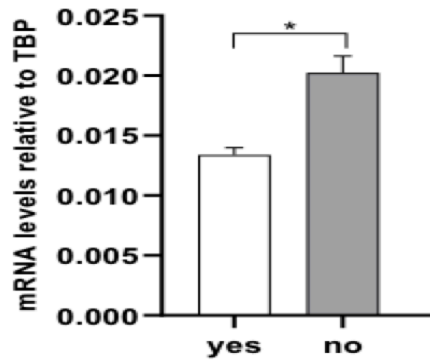


Figura 20. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di TNF alpha in funzione alla presenza o assenza di regressione

IL-6

Per l'IL-6, seppur superiore nei melanomi, non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nell'espressione di mRNA nel tessuto adiposo sottocutaneo tra il gruppo melanoma e nevi melanocitari e gruppo melanoma e cisti epidermoide. Dalla stratificazione del risultato sulla base dello stadio patologico (pTNM) del melanoma non è emerso alcun dato significativo.

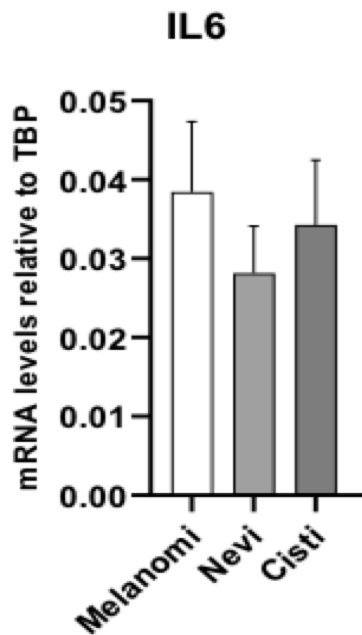


Figura 21. Rappresentazione grafica dell'espressione di mRNA dell'IL-6 nei melanomi e nei gruppi controllo rispetto a TBP

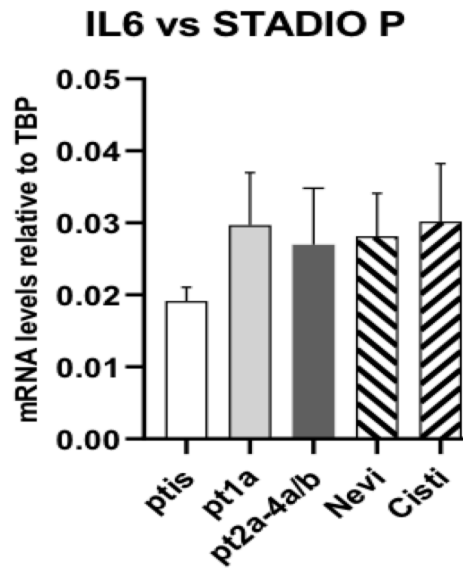


Figura 22. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di IL-6 in funzione della classificazione pTNM di malattia

Analizzando i risultati dell'espressione dell'mRNA in relazione allo spessore di Breslow (lesioni in situ, <1 mm e > 1 mm) non è stata riscontrata alcuna significatività statistica. In riferimento al livello di Clark (suddividendo i pazienti con melanoma in 2 gruppi, livello di Clark 0 e livello di Clark compreso tra II e IV), non è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra i sottogruppi di melanoma considerati. Assente la significatività statistica dell'espressione dell'mRNA di IL-6 rispetto al parametro di regressione istologica (presente/assente).

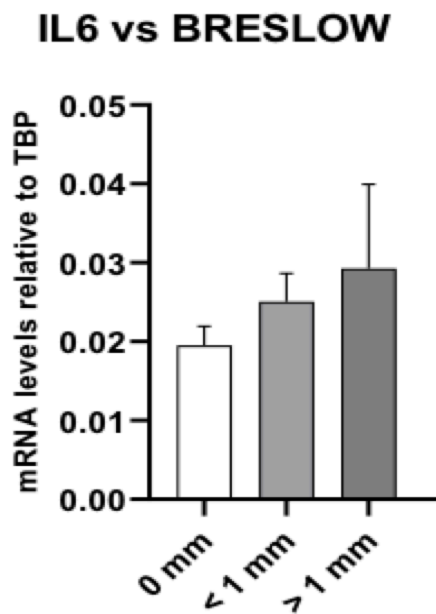


Figura 23. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di IL-6 in funzione dello spessore di Breslow

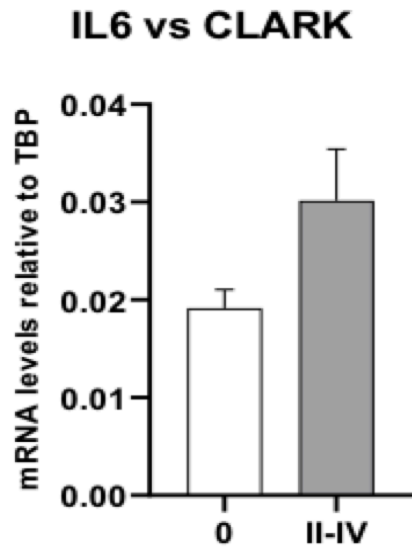


Figura 24. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di IL-6 in funzione dello stadio di Clark

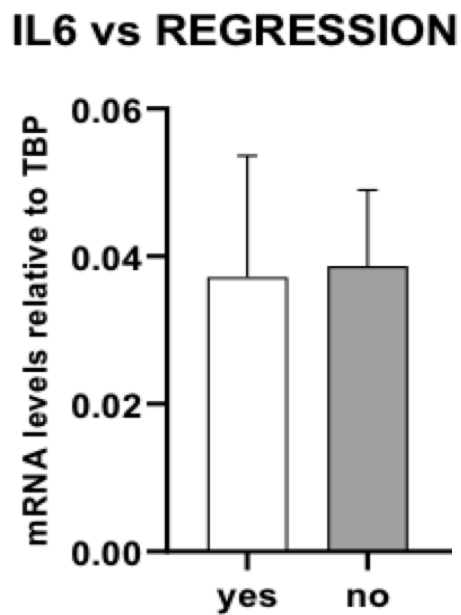


Figura 25. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di IL-6 in funzione della regressione istologica

Per quanto riguarda infine la stratificazione dei risultati in base alla presenza o assenza di flogosi e di mitosi all'esame istologico, è stata riscontrata un'aumentata espressione il mRNA di IL-6 rispetto a TBP rispettivamente nei melanomi in assenza di flogosi linfocitaria e di numero di mitosi seppur tale differenza non ha raggiunto la significatività statistica.

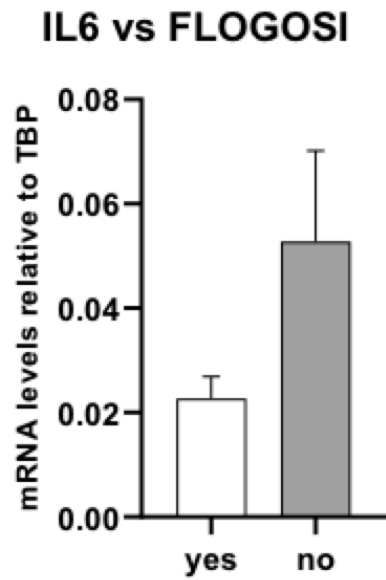


Figura 26. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di IL-6 in funzione della flogosi linfocitaria

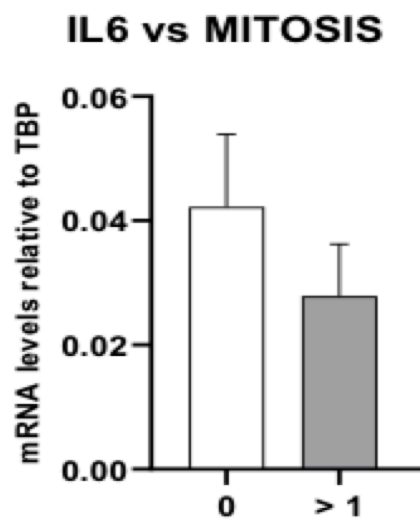


Figura 27. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di IL-6 in funzione del numero di mitosi

PAI1

Per quanto riguarda il PAI1, seppur superiore nei melanomi, non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nell'espressione di mRNA nel tessuto adiposo sottocutaneo tra il gruppo melanoma e nevi melanocitari e gruppo melanoma e cisti epidermoide. Dalla stratificazione del risultato sulla base dello stadio patologico (pTNM) è emersa una differenza statisticamente significativa tra melanomi intraepidermici, stadio pT1, nevi melanocitari, cisti epidermoidi e melanomi appartenenti alla categoria stadio II-IV nei quali l'espressione risulta aumentata ($p < 0.05$).

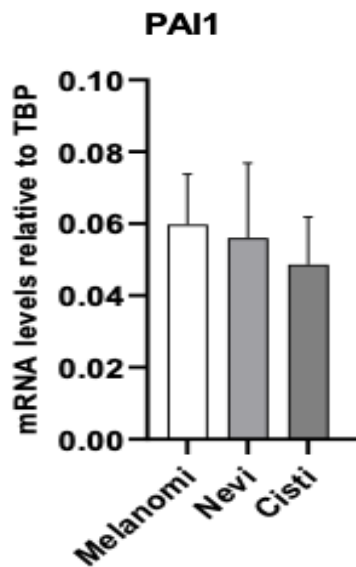


Figura 28. Rappresentazione grafica dell'espressione di mRNA di PAI1 nei melanomi e nei gruppi controllo rispetto a TBP

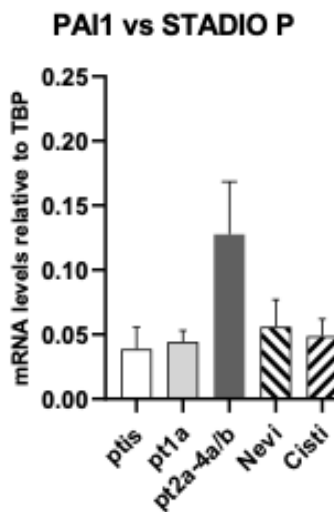


Figura 29. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di PAI1 in funzione della classificazione pTNM di malattia

Analizzando i risultati dell'espressione dell'mRNA in relazione allo spessore di Breslow (lesioni in situ, <1 mm e > 1 mm) è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra espressione nei melanomi spessi nei quali risulta aumentata e melanomi sottili o intraepidermici. In riferimento al livello di Clark (suddividendo i pazienti con melanoma in 2 gruppi, livello di Clark 0 e livello di Clark compreso tra II e IV), non è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra i sottogruppi di melanoma considerati, nonostante anche in tal caso l'espressione di PAI1 risulti aumentata nei melanomi spessi.

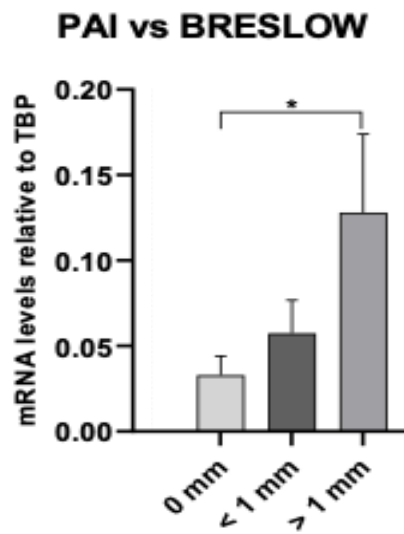


Figura 30. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di PAI1 in funzione dello spessore di Breslow

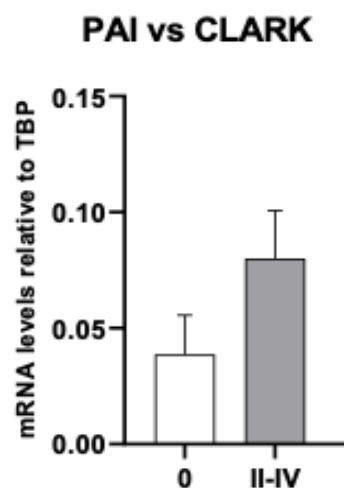


Figura 31. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di PAI1 in funzione del livello di Clark

Considerando il numero di mitosi (0 o >1 mm²) l'espressione di PAI1 è risultata aumentata in maniera statisticamente significativa nei melanomi con numero di mitosi $>$ a 1 mm².

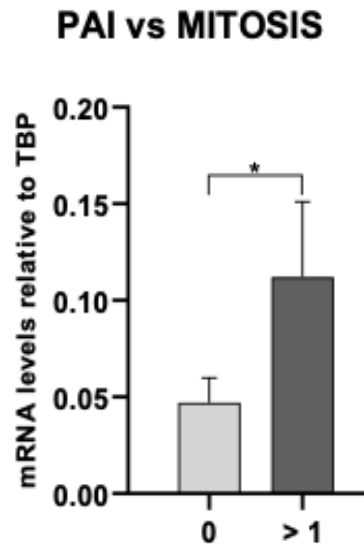


Figura 32. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di PAI1 in funzione del numero di mitosi

Per quanto riguarda la stratificazione dei risultati in base alla presenza o assenza di flogosi, si è riscontrata una differenza statisticamente significativa nell'espressione di PAI1 che è risultata aumentata nei melanomi con flogosi linfocitaria rispetto ai melanomi in assenza di flogosi ($p < 0.05$)

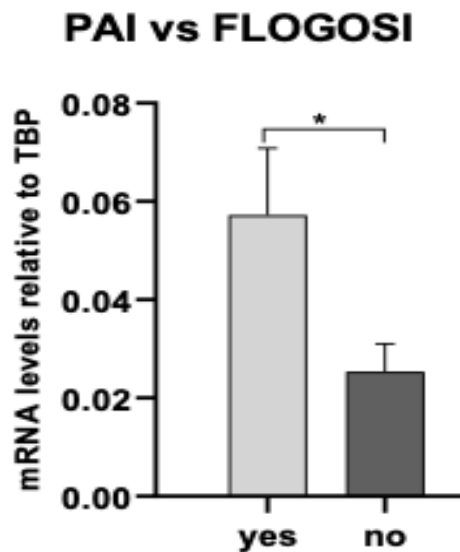


Figura 33. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di PAI1 in funzione della flogosi linfocitaria

Assente la significatività statistica dell'espressione dell'mRNA di PAI1 rispetto al parametro di regressione istologica (presente/assente).

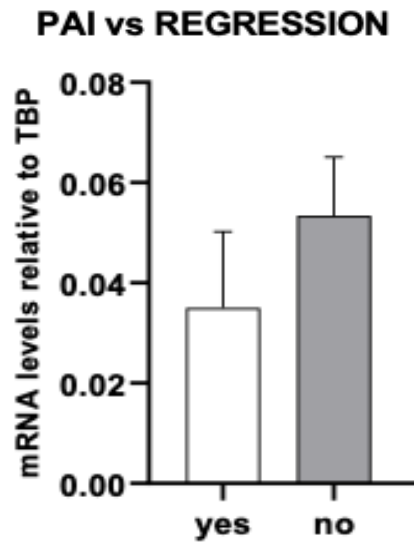


Figura 34. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di PAI1 in funzione della regressione istologica

LEP

Per quanto riguarda il LEP, seppur superiore nei melanomi, non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nell'espressione di mRNA nel tessuto adiposo sottocutaneo tra il gruppo melanoma e nevi melanocitari e gruppo melanoma e cisti epidermoide. Dalla stratificazione del risultato sulla base dello stadio patologico (pTNM) è emersa una differenza statisticamente significativa tra melanomi appartenenti alla categoria stadio II-IV nei quali l'espressione risulta aumentata ($p < 0.05$) e i gruppi controlli (nevi melanocitari e cisti epidermoidi).

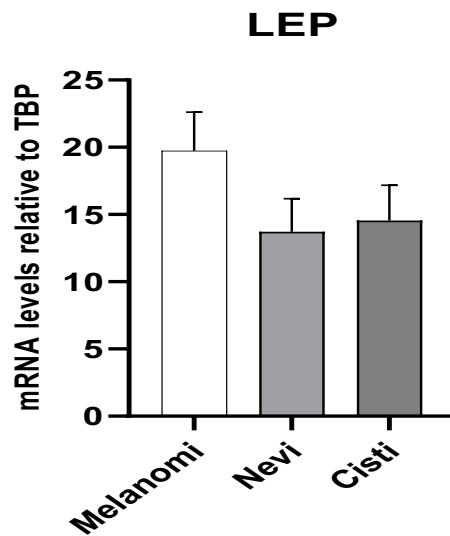


Figura 35. Rappresentazione grafica dell'espressione di mRNA di LEP nei melanomi e nei gruppi controllo rispetto a TBP

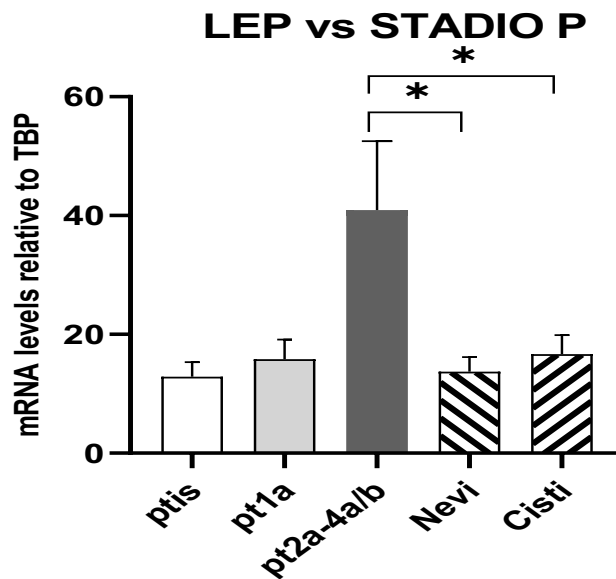


Figura 36. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di LEP in funzione della classificazione pTNM di malattia

Analizzando i risultati dell'espressione dell'mRNA di LEP in relazione allo spessore di Breslow (lesioni in situ, <1 mm e > 1 mm) è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra espressione nei melanomi spessi nei quali risulta aumentata e melanomi intraepidermici ($p < 0.05$). Anche in riferimento al livello di Clark (suddividendo i pazienti con melanoma in 2 gruppi, livello di Clark 0 e livello di Clark compreso tra II e IV), è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra i sottogruppi di melanoma considerati, riscontrando un aumento significativo dell'espressione di PAI1 nei melanomi categorizzati come livello di Clark II-IV rispetto al livello di Clark 0 ($p < 0.05$).

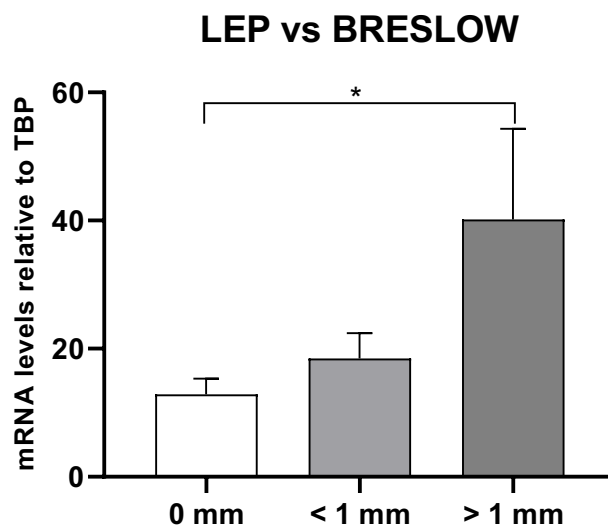


Figura 37. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di LEP in funzione dello spessore di Breslow

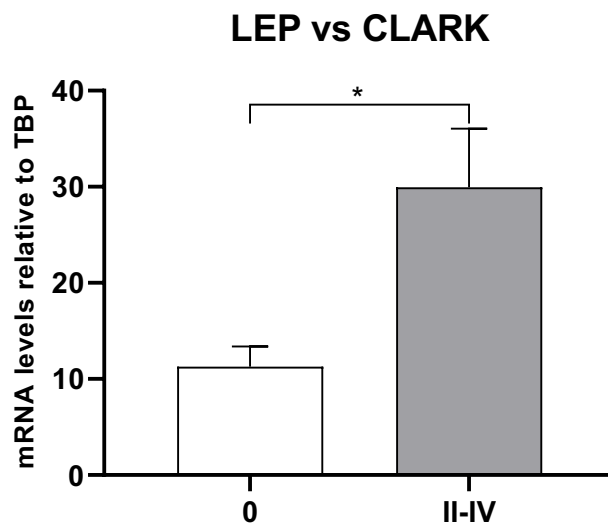


Figura 38. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di LEP in funzione del livello di Clark

Considerando il numero di mitosi (0 o >1 mm²) l'espressione di LEP è risultata aumentata in maniera statisticamente significativa nei melanomi con numero di mitosi > a 1 mm² (p<0.01).

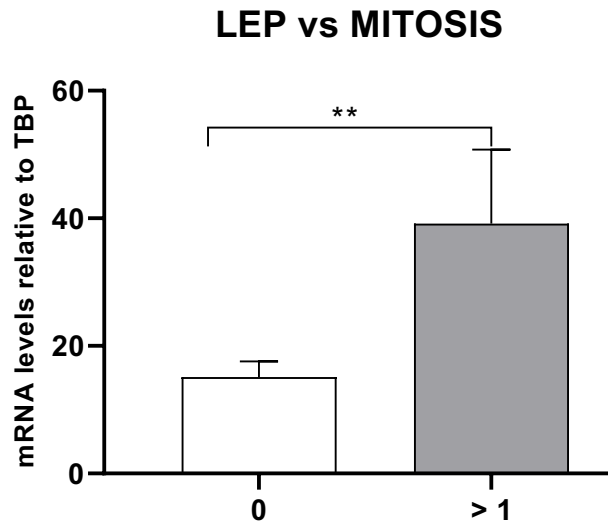


Figura 39. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di LEP in funzione del numero di mitosi

Per quanto concerne la stratificazione dei risultati in base alla presenza o assenza di flogosi, si è riscontrata una differenza statisticamente significativa nell'espressione di LEP che è risultata aumentata nei melanomi con flogosi linfocitaria rispetto ai melanomi in assenza di flogosi (p < 0.05)

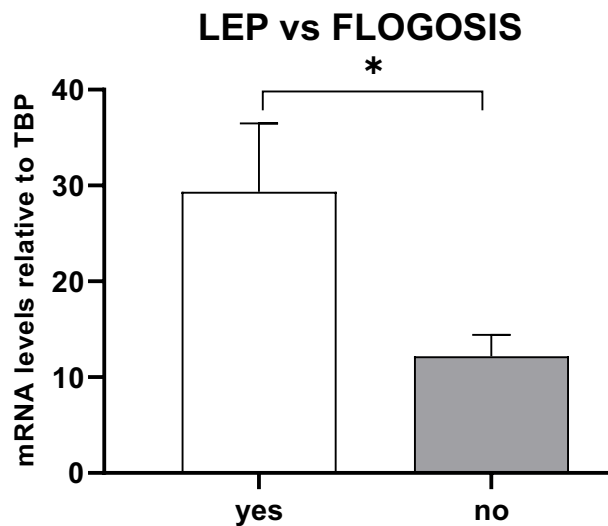


Figura 40. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di LEP in funzione della flogosi linfocitaria

Assente la significatività statistica dell'espressione dell'mRNA di LEP rispetto al parametro di regressione istologica (presente/assente).

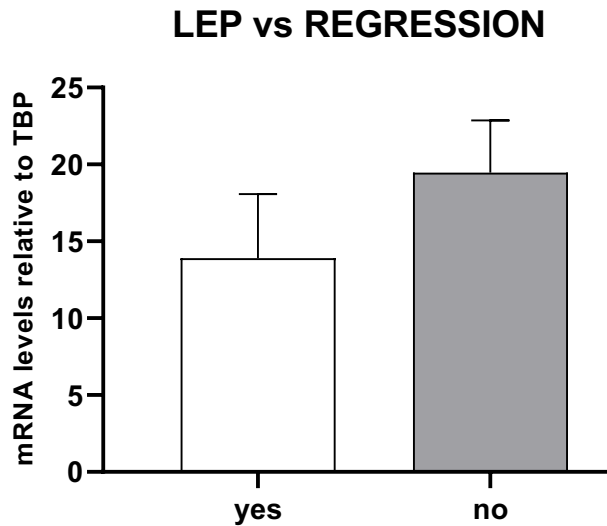


Figura 41. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di LEP in funzione della regressione istologica

IGF1

Per quanto concerne l'espressione dell'IGF1, non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa dell'espressione di mRNA nel tessuto adiposo sottocutaneo tra il gruppo melanoma e i gruppi controllo nevi melanocitari e cisti epidermoide. Dalla stratificazione del risultato sulla base dello stadio patologico (pTNM) non è emersa una differenza statisticamente significativa tra le categorie pTNM dei melanomi analizzati.

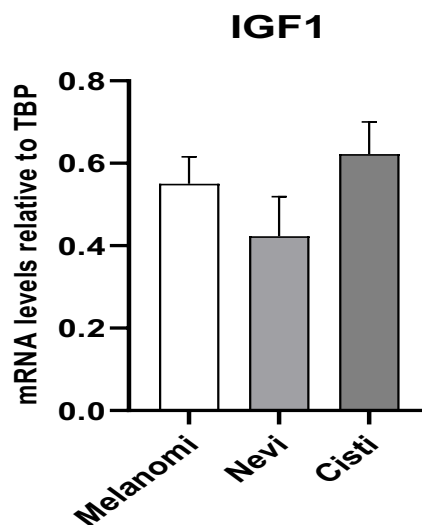


Figura 42. Rappresentazione grafica dell'espressione di mRNA di IGF1 nei melanomi e nei gruppi controllo rispetto a TBP

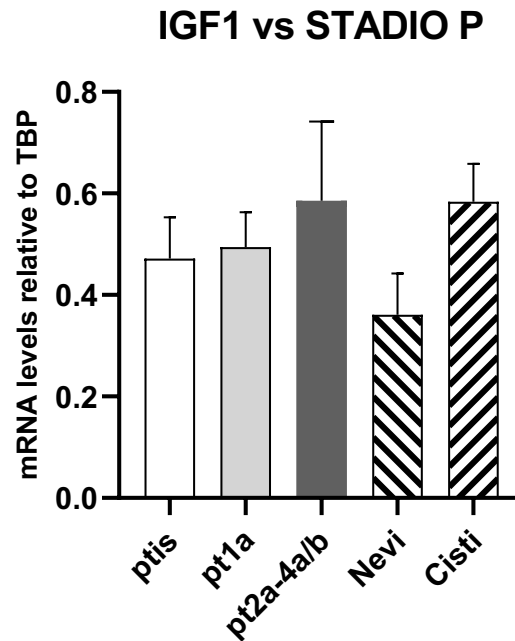


Figura 43. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di IGF1 in funzione della classificazione pTNM di malattia

Analizzando i risultati dell'espressione dell'mRNA in relazione allo spessore di Breslow (lesioni in situ, <1 mm e > 1 mm) non è stata riscontrata alcuna significatività statistica. In riferimento al livello di Clark (suddividendo i pazienti con melanoma in 2 gruppi, livello di Clark 0 e livello di Clark compreso tra II e IV), non è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra i sottogruppi di melanoma considerati.

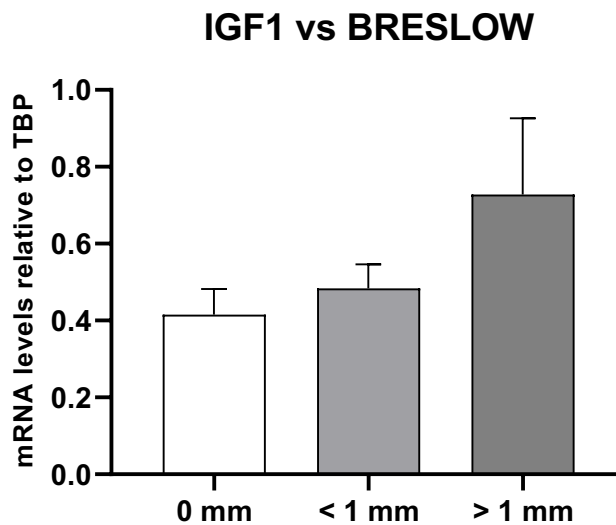


Figura 44. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di IGF1 in funzione dello spessore di Breslow

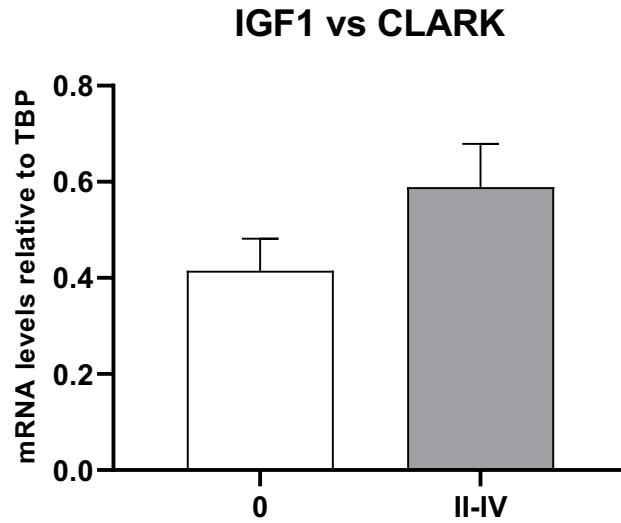


Figura 45. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di IGF1 in funzione del livello di Clark

Assente la significatività statistica dell'espressione dell'mRNA di IGF1 in relazione ai parametri istologici di numero di mitosi, infiltrato flogistico e regressione istologica.

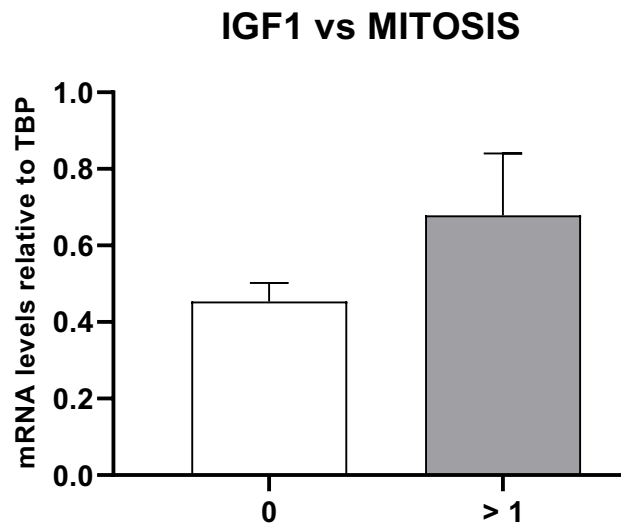


Figura 46. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di IGF1 in funzione della regressione istologica

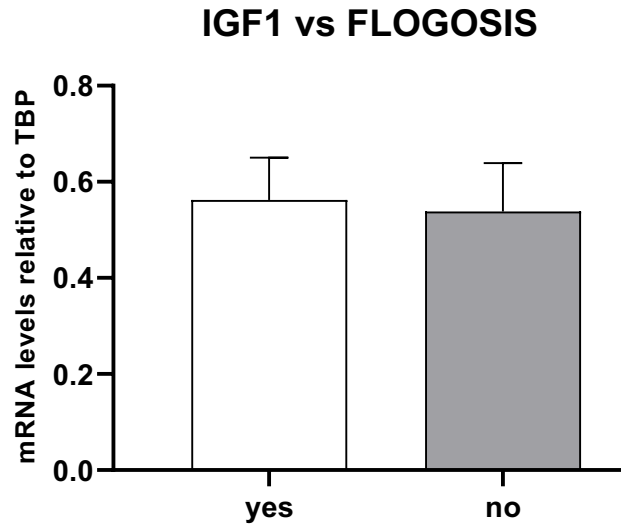


Figura 47. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di IGF1 in funzione della flogosi linfocitaria

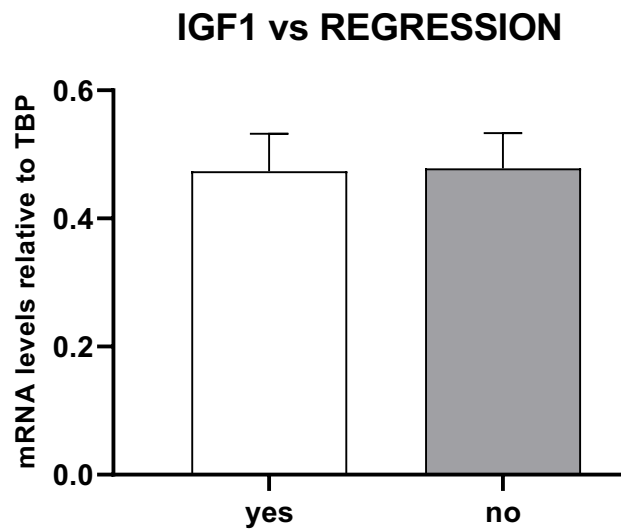


Figura 48. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di IGF1 in funzione della regressione istologica

VEGFA

Analizzando l'espressione del VEGFA, non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa dell'espressione di mRNA nel tessuto adiposo sottocutaneo tra il gruppo melanoma e i gruppi controllo nevi melanocitari e cisti epidermoide. Dalla stratificazione del risultato sulla base dello stadio patologico (pTNM) non è emersa una differenza statisticamente significativa tra le categorie pTNM dei melanomi analizzati.

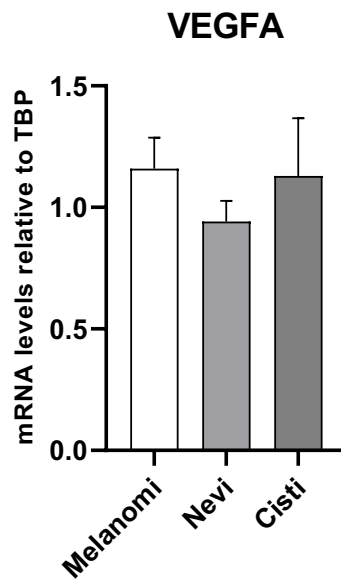


Figura 49. Rappresentazione grafica dell'espressione di mRNA di VEGFA nei melanomi e nei gruppi controllo rispetto a TBP

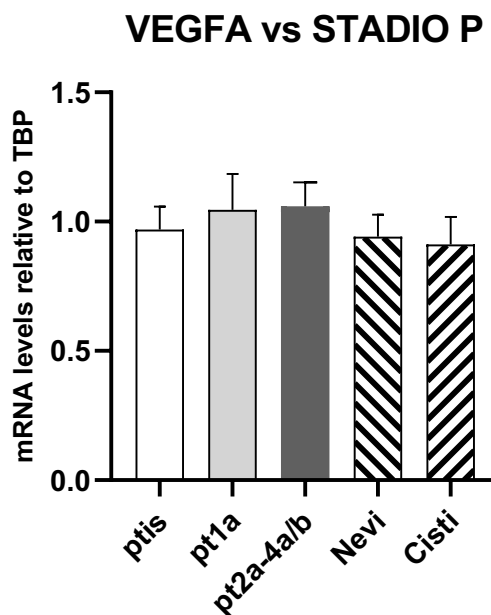


Figura 50. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di VEGFA in funzione della classificazione pTNM di

Analizzando i risultati dell'espressione dell'mRNA in relazione allo spessore di Breslow (lesioni in situ, <1 mm e > 1 mm) non è stata riscontrata alcuna significatività statistica. In riferimento al livello di Clark (suddividendo i pazienti con melanoma in 2 gruppi, livello di Clark 0 e livello di Clark compreso tra II e IV), non è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra i sottogruppi di melanoma considerati.

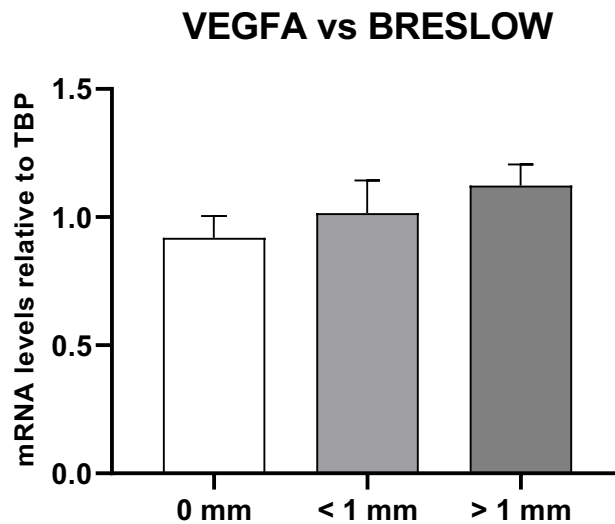


Figura 51. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di VEGFA in funzione dello spessore di Breslow

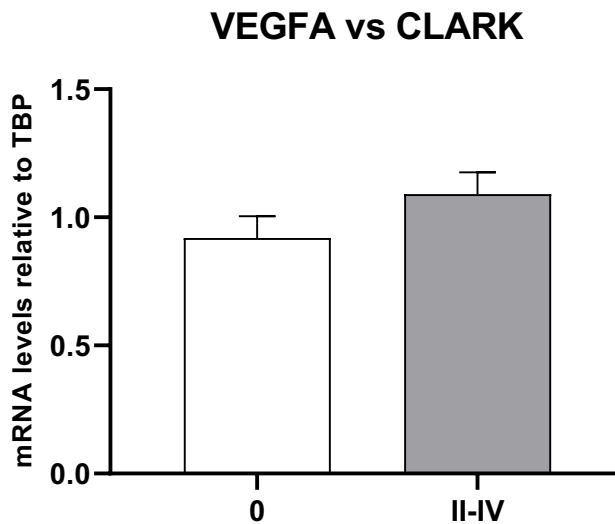


Figura 52. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di VEGFA in funzione del livello di Clark

Assente la significatività statistica dell'espressione dell'mRNA di IGF1 in relazione ai parametri istologici di numero di mitosi, infiltrato flogistico e regressione istologica nella popolazione dei melanomi analizzati.

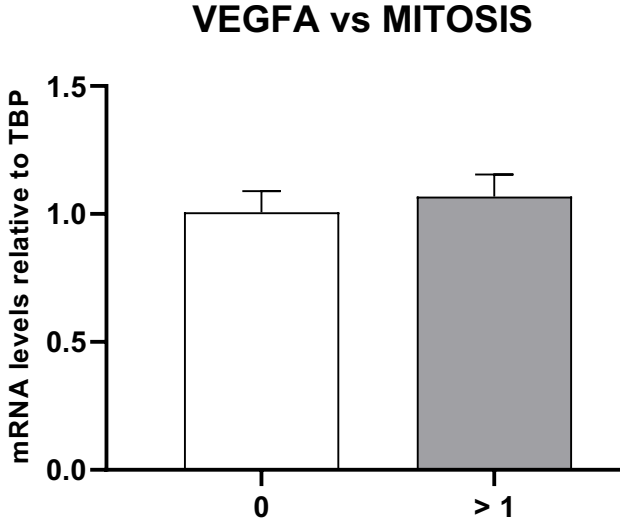


Figura 53. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di VEGFA in funzione del numero delle mitosi

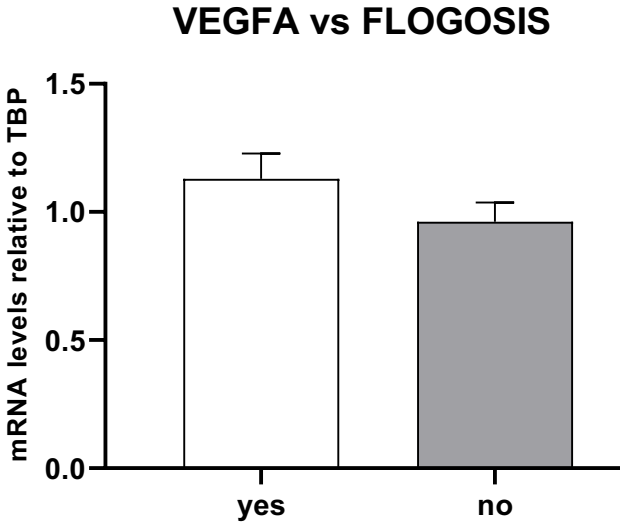


Figura 54. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di VEGFA in funzione della flogosi linfocitaria

VEGFA vs REGRESSION

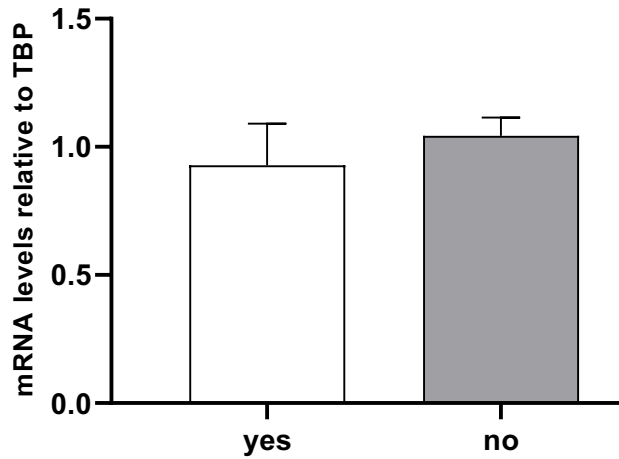


Figura 55. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di VEGFA in funzione della regressione istologica

NAMPT

Analizzando l'espressione di NAMPT, seppur superiore nei melanomi, non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nell'espressione di mRNA nel tessuto adiposo sottocutaneo tra il gruppo melanoma e nevi melanocitari e gruppo melanoma e cisti epidermoide. Dalla stratificazione del risultato sulla base dello stadio patologico (pTNM) è emersa una differenza statisticamente significativa tra melanomi appartenenti alla categoria stadio II-IV nei quali l'espressione risulta aumentata e nevi melanocitari ($p < 0.05$).

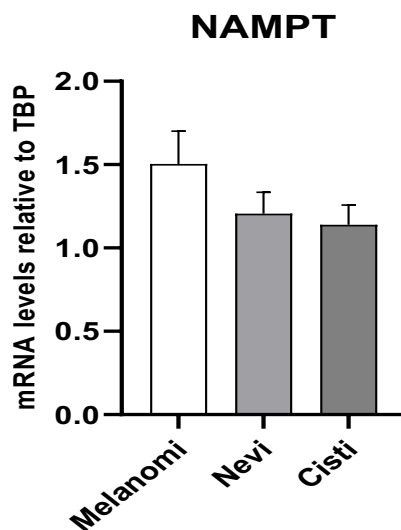


Figura 56. Rappresentazione grafica dell'espressione di mRNA di NAMPT nei melanomi e nei gruppi controllo rispetto a TBP

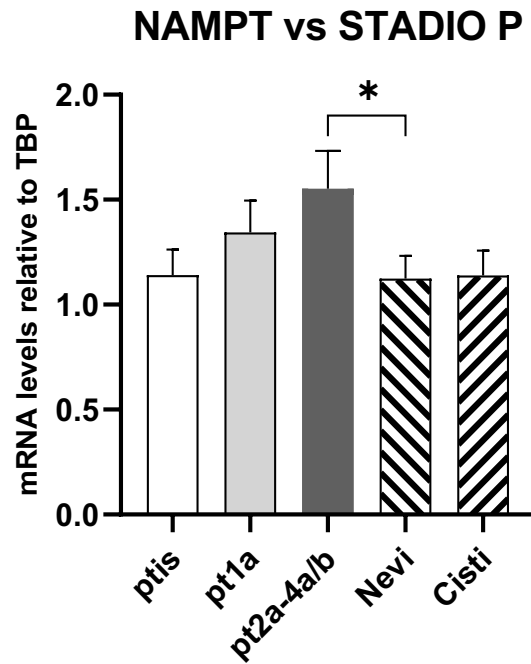


Figura 57. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di NAMPT in funzione della classificazione pTNM di malattia

Analizzando i risultati dell'espressione dell'mRNA di NAMPT in relazione allo spessore di Breslow (lesioni in situ, <1 mm e > 1 mm) è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra espressione nei melanomi spessi nei quali risulta aumentata e melanomi intraepidermici ($p < 0.05$). Anche in riferimento al livello di Clark (suddividendo i pazienti con melanoma in 2 gruppi, livello di Clark 0 e livello di Clark compreso tra II e IV), è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra i sottogruppi di melanoma considerati, riscontrando un aumento significativo dell'espressione di NAMPT nei melanomi categorizzati come livello di Clark II-IV rispetto al livello di Clark 0 ($p < 0.05$).

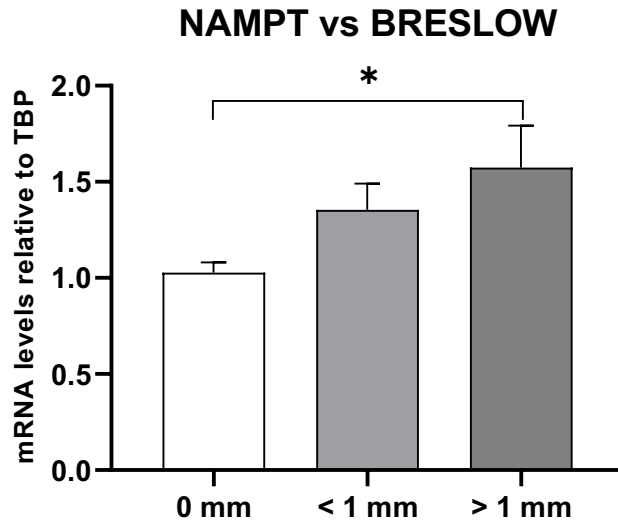


Figura 58. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di NAMPT in funzione dello spessore di Breslow

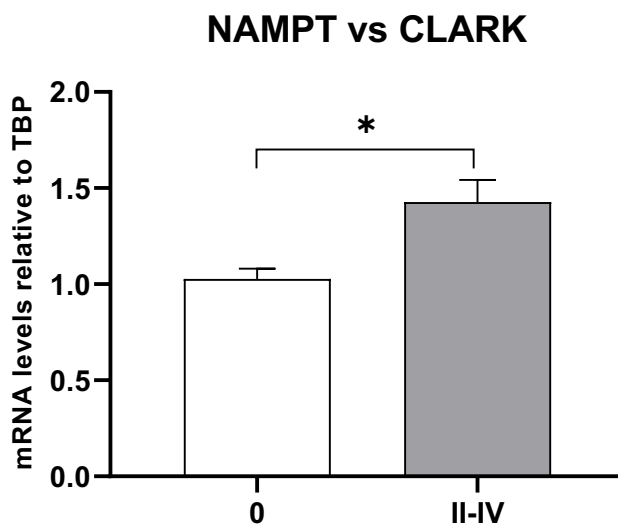


Figura 59. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di NAMPT in funzione del livello di Clark

Assente la significatività statistica dell'espressione dell'mRNA di NAMPT in relazione ai parametri istologici di numero di mitosi, infiltrato flogistico e regressione istologica della popolazione dei melanomi.

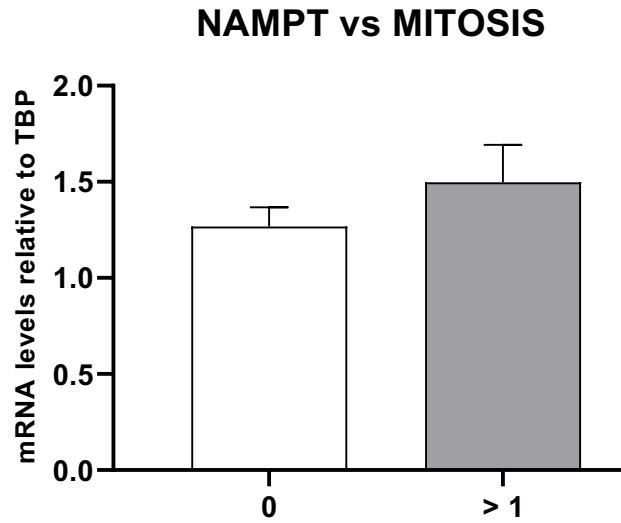


Figura 60. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di NAMPT in funzione del numero di mitosi

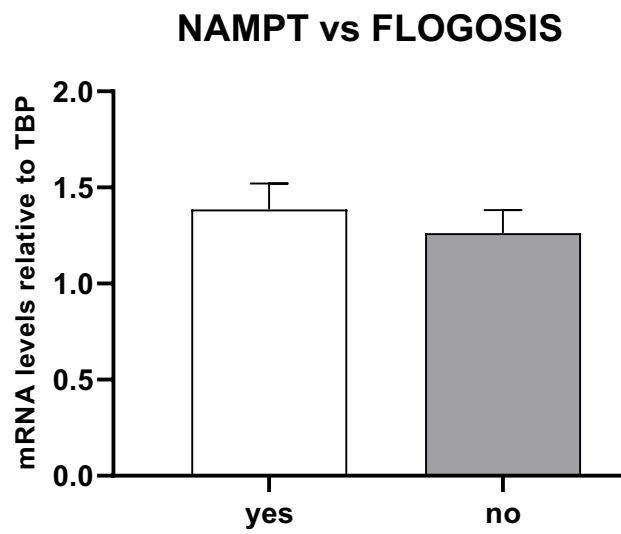


Figura 61. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di NAMPT in funzione della flogosi linfocitaria

NAMPT vs REGRESSION

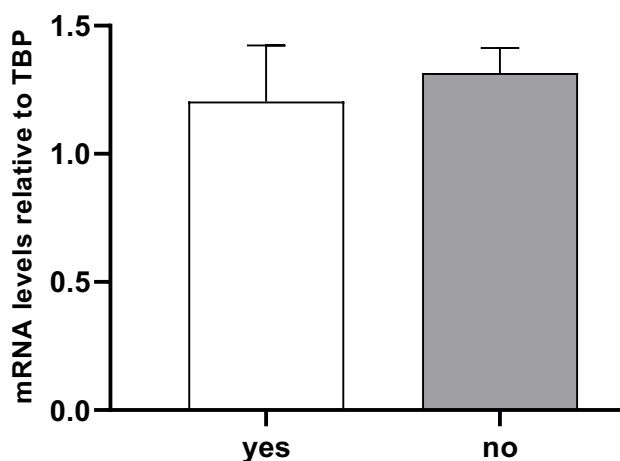


Figura 62. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di NAMPT in funzione della regressione istologica

CXCL1

Analizzando l'espressione di NAMPT, seppur superiore nei melanomi, non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nell'espressione di mRNA nel tessuto adiposo sottocutaneo tra il gruppo melanoma e nevi melanocitari e gruppo melanoma e cisti epidermoide. Dalla stratificazione del risultato sulla base dello stadio patologico (pTNM) è emersa una differenza statisticamente significativa tra melanomi appartenenti alla categoria stadio II-IV nei quali l'espressione risulta aumentata ed entrambi i gruppi controllo ovvero nevi melanocitari ($p < 0.05$) e cisti epidermoidi ($p < 0.05$).

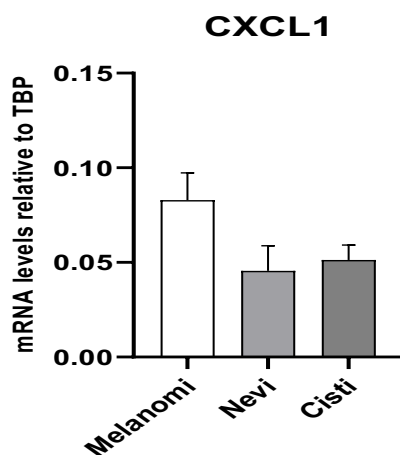


Figura 63. Rappresentazione grafica dell'espressione di mRNA di CXCL1 nei melanomi e nei gruppi controllo rispetto a TBP

CXCL1 vs STADIO P

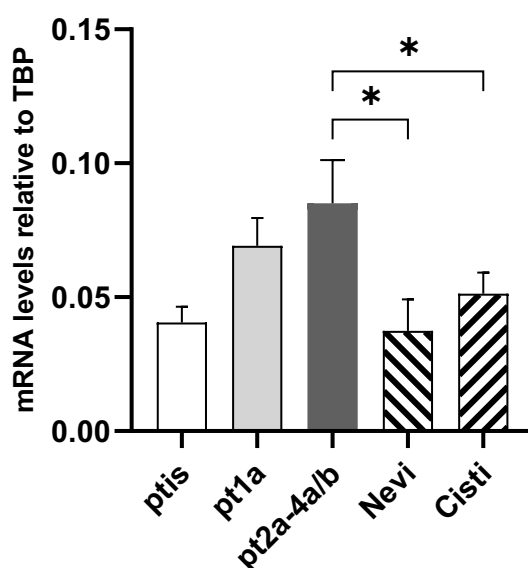


Figura 64. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di CXCL1 in funzione della classificazione pTNM di malattia

Analizzando i risultati dell'espressione dell'mRNA di CXCL1 in relazione allo spessore di Breslow (lesioni in situ, <1 mm e > 1 mm) è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra espressione nei melanomi spessi nei quali risulta aumentata e melanomi intraepidermici ($p < 0.05$) e melanomi sottili ($p < 0.05$). Anche in riferimento al livello di Clark (suddividendo i pazienti con melanoma in 2 gruppi, livello di Clark 0 e livello di Clark compreso tra II e IV), è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra i sottogruppi di melanoma considerati, riscontrando un aumento significativo dell'espressione di CXCL1 nei melanomi categorizzati come livello di Clark II-IV rispetto al livello di Clark 0 ($p < 0.05$).

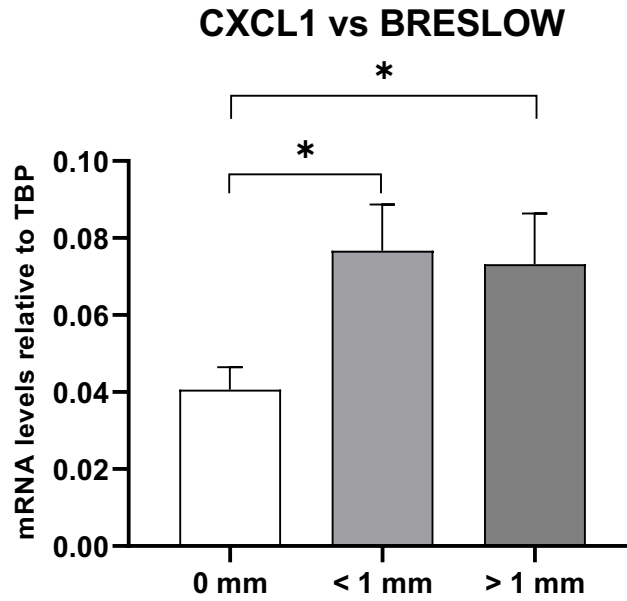


Figura 65. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di CXCL1 in funzione dello spessore di Breslow

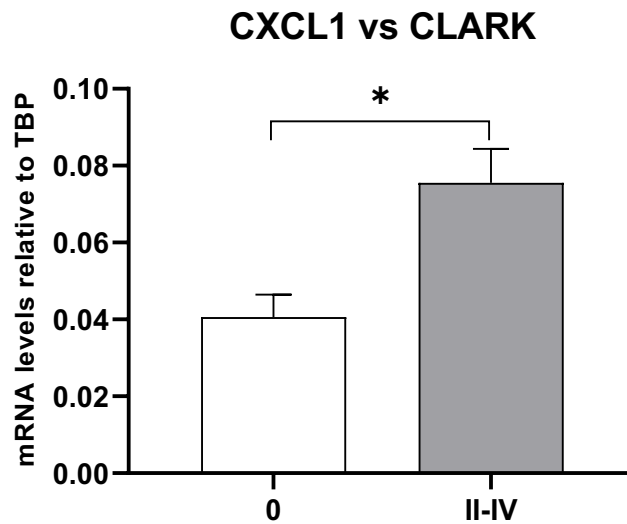


Figura 66. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di CXCL1 in funzione al livello di Clark

Assente una differenza statisticamente significativa nell'espressione dell'mRNA di CXCL1 in relazione ai parametri istologici di numero di mitosi, infiltrato flogistico e regressione istologica della popolazione dei melanomi.

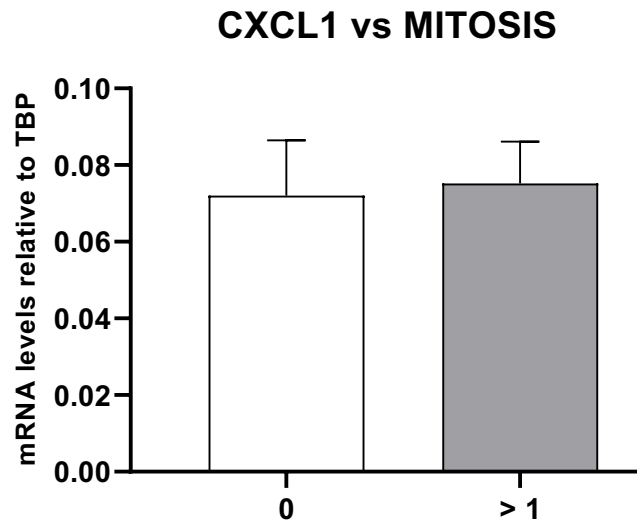


Figura 67. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di CXCL1 in funzione del numero delle mitosi

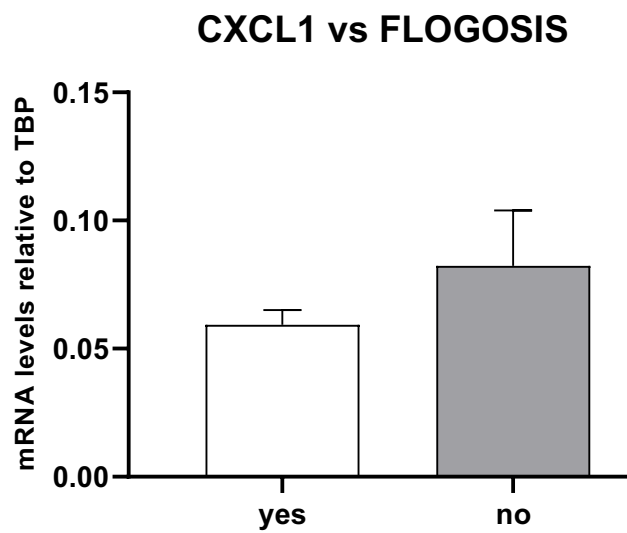


Figura 68. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di CXCL1 in funzione della flogosi linfocitaria

CXCL1 vs REGRESSION

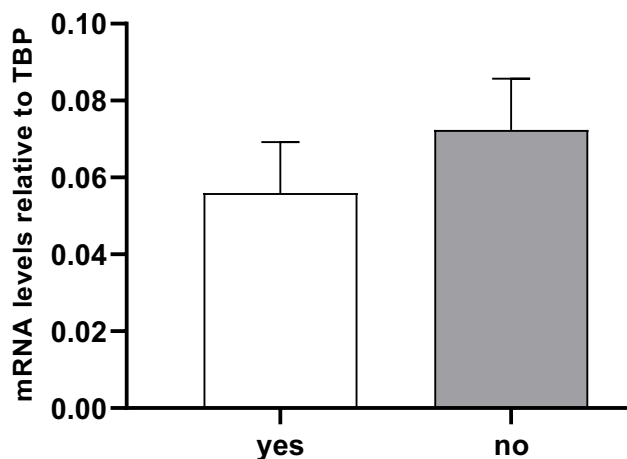


Figura 69. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di CXCL1 in funzione della regressione istologica

CXCL8

Analizzando l'espressione del CXCL8, non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa dell'espressione di mRNA nel tessuto adiposo sottocutaneo tra il gruppo melanoma e i gruppi controllo nevi melanocitari e cisti epidermoide. Dalla stratificazione del risultato sulla base dello stadio patologico (pTNM) non è emersa una differenza statisticamente significativa tra le categorie pTNM dei melanomi analizzati.

CXCL8

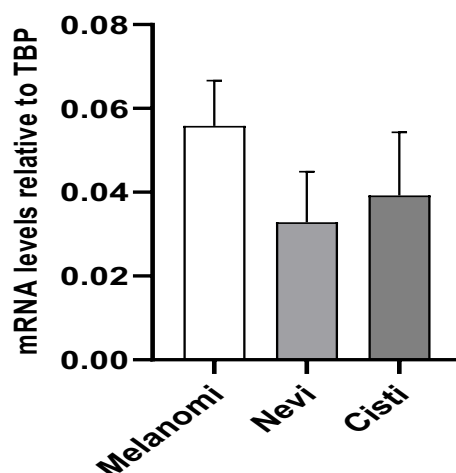


Figura 70. Rappresentazione grafica dell'espressione di mRNA di CXCL8 nei melanomi e nei gruppi controllo rispetto a TBP

CXCL8 vs STADIO P

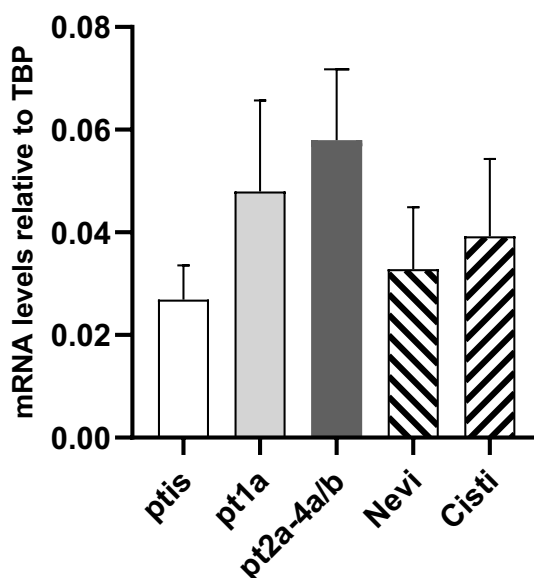


Figura 71. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di CXCL8 in funzione della classificazione pTNM di malattia

Analizzando i risultati dell'espressione dell'mRNA in relazione allo spessore di Breslow (lesioni in situ, <1 mm e > 1 mm) non è stata riscontrata alcuna significatività statistica. In riferimento al livello di Clark (suddividendo i pazienti con melanoma in 2 gruppi, livello di Clark 0 e livello di Clark compreso tra II e IV), non è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra i sottogruppi di melanoma considerati.

CXCL8 vs BRESLOW

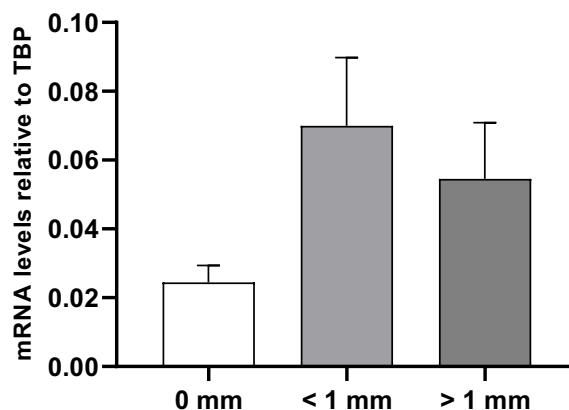


Figura 72. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di CXCL8 in funzione dello spessore di Breslow

CXCL8 vs CLARK

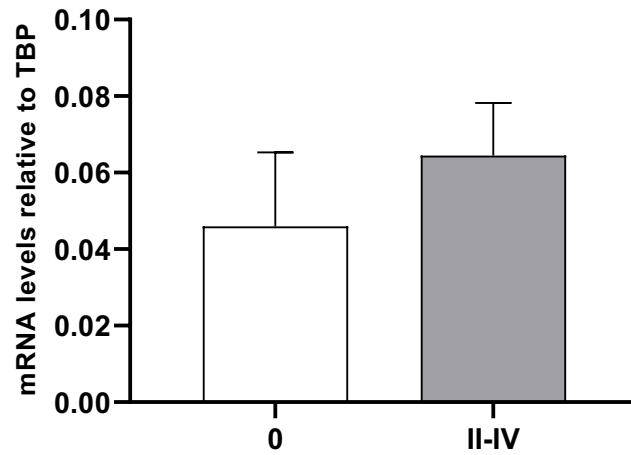


Figura 73. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di CXCL8 in funzione al livello di Clark

Assente la significatività statistica dell'espressione dell'mRNA di CXCL8 rispetto ai parametri di numero di mitosi, assenza/presenza di flogosi linfocitaria e di regressione istologica.

CXCL8 vs MITOSIS

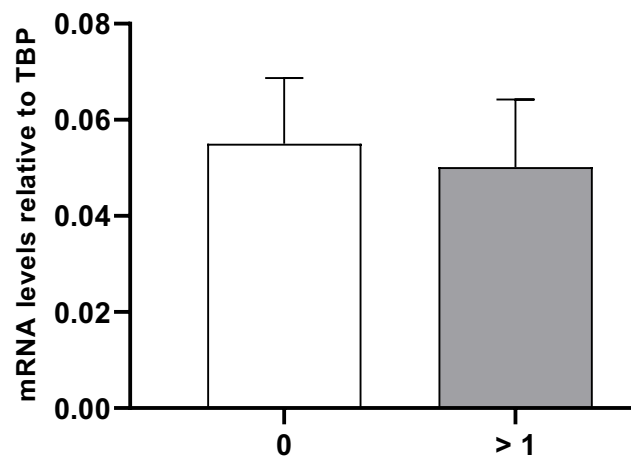


Figura 74. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di CXCL8 in funzione del numero delle mitosi

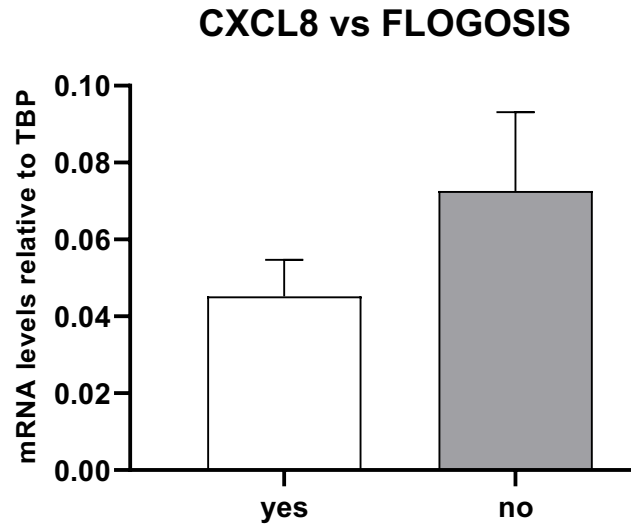


Figura 75. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di CXCL8 in funzione della flogosi linfocitaria

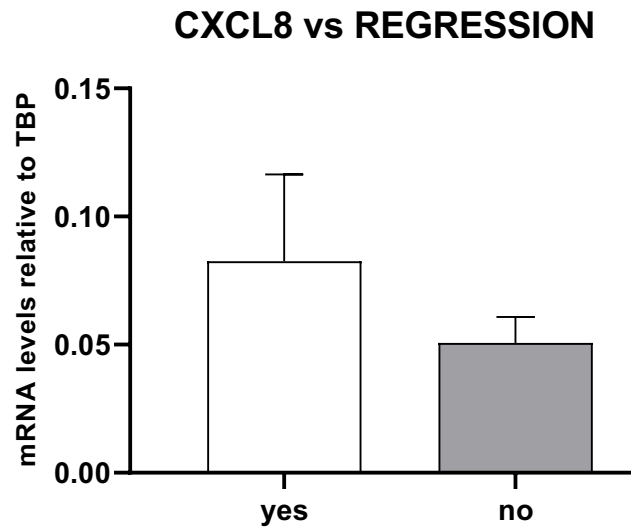


Figura 76. Rappresentazione grafica della stratificazione dell'espressione dell'mRNA di CXCL8 in funzione della regressione istologica

DISCUSSIONE

Le mutate abitudini personali (esposizione solare intermittente ed intensa) e la maggiore propensione individuale ad aderire a screening con aumento delle diagnosi precoci, contribuiscono solo in parte a spiegare il graduale ma pressoché costante (con lieve flessione negli ultimi anni) aumento di incidenza della neoplasia. Esistono dati che dimostrano un legame statisticamente significativo, tra obesità (condizione patologica che nel corso degli anni è drammaticamente incrementata in tutto il mondo, con prevalenza più che raddoppiata dal 1980 ad oggi) e sviluppo del melanoma. Recenti studi su modelli murini e umani hanno messo in evidenza come la prognosi della neoplasia sia negativamente influenzata da un incremento patologico del body mass index (BMI), con maggiore propensione alla diffusione della malattia alle stazioni linfonodali locoregionali e metastatizzazione sistemica della stessa. È stato ampiamente e più volte dimostrato che le cellule del melanoma cutaneo assumono una capacità maggiore di andare incontro a mitosi se co-coltivate in presenza di adipociti, o del loro mezzo di coltura, in assenza di adipociti vitali (il che dimostra la presenza di sostanze presenti nel mezzo di coltura capaci di influenzare il comportamento biologico della neoplasia).²⁵⁰

Parallelamente nel corso degli anni, è andato delineandosi il concetto che il tessuto adiposo, sia viscerale che sottocutaneo, non vada semplicisticamente considerato un apparato di stoccaggio metabolico, ma un vero e proprio organo con molteplici funzioni, tra cui quella endocrina, con secrezione di adipocitochine ad effetto sia paracrino, autocrino ed endocrino, secrete dagli adipociti stessi sia facenti parte del tessuto adiposo sottocutaneo che del tessuto adiposo viscerale, o dalle cellule infiammatorie colonizzanti il tessuto adiposo peritumorale e viscerale, che con un meccanismo di “stato cronico di infiammazione di basso grado” contribuirebbero alla secrezione di citochine con effetto promuovente la crescita della neoplasia. Numerosi sono i dati ottenuti da colture cellulari e/o da modelli murini di melanoma, a sostegno del fatto che tali sostanze (principalmente leptina, resistina, IGF-1, IL-6, IL-8, IL-11, LIF, PAI-1, FGF-2, endocan, HGF, VEGF, RBP-4) contribuiscano ad aumentare la proliferazione dei melanociti neoplastici e a favorire la loro capacità di andare incontro a fenomeni di crescita senza inibizione da contatto. Le adipocitochine sembrerebbero inoltre coinvolte nei complessi fenomeni di attivazione ed inattivazione genica alla base della genesi tumorale, esercitando quindi un ruolo chiave nella regolazione dell’epitelial-mesenchymal transition (EMT) meccanismo coinvolto nel processo di metastatizzazione, dell’angiogenesi dello stroma tumorale, fino alla creazione di “canali simil-vascolari” costituiti da melanociti maligni stessi, all’interno del melanoma, con

particolare disposizione tridimensionale, aspetto recentemente individuato ed interpretato come correlabile a maggiore aggressività della neoplasia stessa.²⁵¹

Inoltre anche il fattore invasività locale sarebbe influenzato dal profilo adipocitochinico, in particolar modo è dimostrabile in modelli murini un ruolo della resistina i cui livelli correlano con quelli della MMP9.²⁵²

È stato inoltre dimostrato come le citochine proinfiammatorie, prodotte dall'infiltrato cellulare infiammatorio che costituisce sino al 50% della cellularità del tessuto adiposo peritumorale (MCP-1, IL6, IL8, PAI1, MCP1) e le adipochine (leptina), contribuiscano ad incrementare la presenza di speci reattive dell'ossigeno (ROS), indicanti stress ossidativo, e di IGF-1, con induzione della proliferazione delle cellule tumorali.²⁵³

Lo stato infiammatorio di basso grado in molti tipi di neoplasia è mantenuto anche dalla presenza di un numero elevato di adipose stem cells (ASC) che dal tessuto adiposo, infiltrano lo stroma tumorale. È stato dimostrato nel carcinoma prostatico e più recentemente nello stesso melanoma cutaneo che le ASC vengono richiamate nel tessuto tumorale mediante l'azione delle chemochine CXCL1 e CXCL8.²⁵⁴

Inoltre, sono in aumento le prove a sostegno del ruolo cardine delle chemochine CXC nella regolazione dell'angiogenesi e della metastatizzazione tumorale. L'angiogenesi, o la crescita di nuovi vasi sanguigni da un sistema vascolare preesistente, è una caratteristica preminente del successo della crescita tumorale di tutti i tumori solidi, tra cui il melanoma.²⁵⁵⁻²⁶⁰

Le ASC, specie in presenza di condizioni di ipertrofia ed iperplasia dello stesso tessuto adiposo (obesità) producono, per un difetto relativo di vascolarizzazione, il fattore HIF1, allo scopo di aumentare la propria ossigenazione. Il compenso dello stato di ossigenazione cellulare è solo parziale e l'ipossia relativa presente porta alla conseguente iperespressione delle citochine infiammatorie sovraccitate, con mantenimento dello stato infiammatorio. Per ciascuna delle citochine infiammatorie è stato dimostrato un effetto di facilitazione della progressione tumorale (tramite iperespressione di metalloproteasi ad esempio) o di stimolo della proliferazione cellulare tumorale.²⁶¹

Esperimenti su modelli murini sembrano attualmente supportare queste ipotesi, tanto che una dieta ricca in acidi grassi porta nel topo con impianto di melanoma, ad una maggiore presenza di HIF1, VEGF, e di markers di presenza di vasi linfatici. Una dieta ricca in acidi grassi determinerebbe anche una maggiore presenza nell'infiltrato infiammatorio tumorale, di macrofagi della linea differenziativa M2, che contribuiscono alla secrezione di citochine con aumento della angiogenesi e linfangiogenesi, oltre che avere un effetto immunosoppressivo, e nel topo tale dieta porta ad una positività del linfonodo sentinella nel 70.4% dei casi contro il

40% dei controlli. In tali linfonodi sono riscontrabili alti livelli di CCL19 e CCL21, citochine chemotattiche.²⁶²

Altri studi sul melanoma in modelli murini hanno rivelato la presenza di polarizzazione verso la differenziazione in linea M1 ed M2 dei macrofagi isolati nel tessuto adiposo peritumorale, con overespressione nel tessuto adiposo stesso di citochine infiammatorie come IL-6, CXCL1, MCP-1, MIP-2 e TIMP-1, più espresse che nel tessuto adiposo non peritumorale, l'infiltrato infiammatorio particolare del tessuto adiposo peritumorale si rende responsabile anche della maggiore secrezione di VEGF, e tale tessuto, coltivato ex vivo, è capace rispetto al normale tessuto adiposo di produrre numerosi vasi sanguigni ex novo. Il tessuto adiposo peritumorale, in tale studio, rispetto al non peritumorale era popolato da adipociti di minore diametro, con lipolisi molto attiva, ed un minore contenuto di lipidi (il che sembra dimostrare comunque un ruolo di fonte di energia).²⁶³

Della leptina, prodotta anche dal tessuto adiposo sottocutaneo-peritumorale, è stato dimostrato il ruolo promotore del processo di metastatizzazione linfatica loco regionale nell'uomo (su serie di 72 linfonodi sentinella), con correlazione statisticamente significativa tra livello sierico di leptina e positività linfonodale, anche analizzando i dati in maniera multivariata, con unico altro fattore predittivo rappresentato dal livello di Breslow, già noto fattore prognostico istologico del MC.²⁵⁰

Anche la funzione di semplice fonte di energia del tessuto adiposo peritumorale ha la sua importanza nella progressione del melanoma, è stato infatti dimostrato come cellule di derivazione mieloide (T-MDSC) infiltranti la neoplasia, abbiano un effetto favorente la progressione neoplastica inibendo la funzione immunitaria delle cellule T, le T-MDSC fondano il proprio substrato energetico proprio nella ossidazione degli acidi grassi, ed è stato dimostrato come il blocco di tale processo biochimico (la cui presenza è dimostrabile tramite livello di espressione genica di enzimi come la CPT1, acilcoa deidrogenasi, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta PGC1 β , e 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase HADHA) inibisce la crescita tumorale, aumenta l'immunogenicità delle neoplasie ed il funzionamento di strategie terapeutiche con target il sistema immunitario), questo in vari tipi di linee cellulari di neoplasie differenti, nel melanoma inoltre (ma non in altre neoplasie) si è dimostrato come la presenza di T-MDSC correli a presenza di NO e perossinitrito.²⁶⁴

Sulla base delle conoscenze attuali, il ruolo del tessuto adiposo sottocutaneo o viscerale sembrerebbe lievemente differente; secondo alcuni autori infatti alcuni effetti sarebbero evocabili da parte del secretoma di entrambe le tipologie di grasso (ad esempio una maggiore capacità adesiva dei melanociti trasformati nei riguardi delle cellule endoteliali), mentre altri effetti sarebbero specificatamente mediati o dalle sostanze secrete dal tessuto adiposo viscerale

(cambiamento di morfologia cellulare – EMT) o da quelle secrete del tessuto adiposo peritumorale (stimolo chemotattico-migratorio, proliferazione indipendente dall'ancoraggio). Alcuni autori, pur riconoscendo un contributo in senso assoluto maggiore, come mantenimento di un microambiente citochinico pro-infiammatorio al tessuto adiposo viscerale, ipotizzano un ruolo tuttavia più attivo del tessuto adiposo peritumorale che contribuirebbe, con effetto paracrino, e quindi “di vicinanza”, allo sviluppo della neoplasia, ma ulteriori studi sono necessari per confermare tale ipotesi e gli studi studi in vivo a riguardo sono scarsi.²⁶⁵⁻²⁶⁷

Lo studio in oggetto si colloca proprio in tale contesto con lo scopo di indagare ed approfondire il ruolo che appare estremamente complesso del microambiente tumorale adiposo nello sviluppo e progressione del melanoma, neoplasia che rispetto ad altri tumori solidi stabilisce con il tessuto adiposo sottocutaneo un rapporto estremamente intimo e profondo poiché si accresce proprio nel suo contesto. I risultati del nostro studio pilota evidenziano, tra le adipochine e citochine infiammatorie analizzate, una modifica statisticamente significativa dell'espressione di PAI1, LEP, NAMPT (visfatina) e CXCL1 nel gruppo melanoma rispetto ai gruppi controllo con caratteristiche differenti a seconda del marker in questione.²⁶⁸

Come già riportato in precedenza, la migrazione delle cellule tumorali è uno dei passaggi essenziali per l'attuazione del processo di metastatizzazione, durante il quale, è richiesta la degradazione proteolitica della matrice extracellulare. Il tale meccanismo sono coinvolti diversi sistemi enzimatici proteolitici, tra cui il sistema di metalloproteasi della matrice e il sistema di attivazione del plasminogeno. Si distinguono 2 attivatori del plasminogeno (PA), noti rispettivamente come attivatori del plasminogeno di tipo tissutale (t-PA) e attivatore del plasminogeno di tipo urochinasasi (u-PA). L'attività di u-PA e t-PA può essere modulata da due inibitori PA specifici, PAI-1 e PAI-2.²⁶⁹⁻²⁷¹

Il coinvolgimento del sistema del PA con riscontro di elevati livelli di u-PA è stato osservato in numerose neoplasie solide in particolare nel carcinoma del colon, della mammella, della vescica e della prostata. Inoltre è stato da decenni dimostrato, usando topi nudi, che nelle linee cellulari di melanoma umano il potenziale metastatico differisce in relazione all'espressione di u-PA, PAI-1 e PAI-2, con tendenza alla metastatizzazione polmonare in particolare in caso di aumentata espressione degli stessi, dopo inoculazione sottocutanea nei topi nudi. Le linee cellulari non metastatiche non producono u-PA, PAI-1 o PAI-2 ma solo t-PA.²⁷⁰⁻²⁷²

Nel nostro studio, per quanto concerne PAI1, abbiamo riscontrato una aumentata espressione dello stesso nei melanomi avanzati con stadio patologico (pTNM) II-IV rispetto i gruppi controlli. L'espressione di PAI1 risulta nella nostra analisi correlata positivamente con lo spessore di Breslow risultando aumentata nei melanomi aventi spessore > 1mm rispetto ai

melanomi in situ. Infine correla positivamente con il numero di mitosi e con la flogosi linfocitaria lesionale.

I dati da noi ottenuti risultano in linea con gli studi in vivo presenti in letteratura sull'argomento. In particolare, *de Vries et al* esaminando l'espressione delle diverse componenti del sistema di attivazione del plasmilogeno in neoformazioni melanocitarie benigne, melanomi in fase early e fase avanzata ed in metastasi linfonodali ha evidenziato l'espressione della proteina t-PA nell'epitelio endoteliale dei vasi sanguigni di lesioni melanocitarie benigne e nei melanomi, incluse nelle metastasi linfonodali. Il PAI risultava esclusivamente rappresentato, come nel nostro caso, nei melanomi avanzati e nelle lesioni metastatiche da melanoma. In particolare dalle indagini immunohistochimiche condotto da *de Vries et al*, è emerso che la proteina PAI1 è localizzata principalmente nella matrice extracellulare peritumorale piuttosto che nelle cellule tumorali stesse di melanoma, convalidando un ruolo attivo nella progressione della patologia soprattutto in termini di invasività loco-regionale e potenziale metastatico.²⁷⁰

Studi più recenti confermano quanto riportato da *de Vries et al*, suggerendo un ruolo cardine di PAI1 nella proteolisi pericellulare e quindi nella promozione della progressione del melanoma. Inoltre *Klein et al* hanno dimostrato come l'espressione di PAI1 si diversifichi quantitativamente a seconda della tipologia di metastasi considerata, risultando una immunoreattività più spiccata in metastasi cutanee rispetto alle metastasi linfonodali.²⁷³

La leptina (LEP) è un'adipochina multifunzionale che esibisce una vasta gamma di ruoli fisiologici nell'omeostasi energetica, nell'infiammazione e nella riproduzione attraverso i suoi recettori.^{274,275} La leptina ha anche dimostrato di avere attività pro-angiogenica e le cellule endoteliali esprimono recettori della leptina funzionalmente attivi.^{276,277} Studi recenti hanno indicato che la leptina e il suo recettore, OB-R, sono sovraespressi in diverse tipologie di neoplasie, dove inducono la crescita del tumore stimolando la proliferazione, l'infiammazione e l'angiogenesi.²⁷⁸⁻²⁸¹ L'angiogenesi è fondamentale per garantire l'apporto di ossigeno e nutrienti per la crescita, l'invasione e le metastasi del tumore.²⁸² La progressione del tumore è associata a un cambiamento nell'equilibrio tra induttori e inibitori dell'angiogenesi.²⁸³ Il VEGF rappresenta come già illustrato in precedenza il principale induttore angiogenico in grado di stimolare la sopravvivenza, la proliferazione, la migrazione e infine la formazione di nuovi vasi.^{284,285} Il livello di espressione di VEGF sembra avere una forte correlazione con la densità dei vasi sanguigni presenti nel tumore e con l'aggressività della neoplasia.²⁸⁶ È stato scoperto che la leptina esercita effetti angiogenici mediati dal potenziamento del VEGF e del recettore 2 del VEGF (VEGFR2) e dall'attivazione del fattore di crescita fibroblastico endogeno-2.^{278,287}

Tuttavia si ritiene che la stimolazione del VEGF non sia l'unica via attraverso la quale si realizza l'angiogenesi tumorale nel melanoma. Recentemente è stato infatti riportato che la leptina è in grado di promuovere la crescita tumorale attraverso meccanismi che coinvolgono la produzione di ossido nitrico (NO), l'aumento del numero di cellule progenitrici endoteliali nel sangue periferico e di conseguenza la vasculogenesi.²⁸⁸

Nonostante i dati in aumento a sostegno del ruolo della leptina nella patogenesi del melanoma, l'esatta relazione tra leptina e melanoma tuttavia non è stata descritta ancora con chiarezza.²⁸⁹⁻²⁹¹

Le cellule del melanoma esprimono i recettori della leptina facendo pertanto desumere che la leptina agisca come fattore di crescita per queste cellule.²⁹² Gogas et al., in uno studio caso-controllo, ha indicato che livelli elevati di leptina rappresentano un fattore di rischio per l'insorgenza del melanoma.²⁹³

Oltre all'effetto angiogenico della leptina nello sviluppo di tumori, ci sono numerosi studi in vivo e in vitro che hanno implicato che questa adipochina promuova la proliferazione di diversi tipi di cellule tumorali.^{294,295} Recentemente è stata descritta l'esistenza di una correlazione significativa tra la leptina e l'indice Ki-67 nel melanoma, suggerendo un altro ruolo importante per la leptina nella crescita del tumore. Ellerhorst et al. hanno dimostrato che le stesse cellule di melanoma secernono anche leptina che può essere responsabile della proliferazione incontrollata delle cellule tumorali.²⁹² Brandon et al. hanno illustrato che la carenza di leptina diminuisce ma non abolisce la crescita del tumore del melanoma.^{296,297} Sorprendentemente, l'antagonismo della leptina da parte dell'anticorpo 9F8 ha un effetto non significativo sulla concentrazione plasmatica di VEGF, sull'angiogenesi e sulla proliferazione del melanoma, suggerendo quindi che non sia solo il VEGF coinvolto nell'angiogenesi tumorale nel melanoma.^{298,299}

Il nostro studio ha evidenziato una aumentata espressione di LEP a livello del tessuto adiposo sottocutaneo nei melanomi avanzati appartenenti allo stato patologico II-IV rispetto ai melanomi sottili e ai controlli. L'espressione di LEP è risultata inoltre positivamente correlata con la totalità dei fattori prognostici analizzati, ovvero lo spessore di Breslow ed il livello di Clark confermando una associazione di espressione con la severità di patologia, numero di mitosi e flogosi linfocitaria, fatta eccezione per la regressione istologica.

La nicotinamide fosforibosiltransferasi (NAMPT) è un enzima che svolge un ruolo chiave nella sintesi del NAD.^{300,301} In particolare catalizza la sintesi della nicotinamide mononucleotide (NMN, il precursore del NAD) da fosforibosil pirofosfato e nicotinamide. Numerosi tumori solidi sovraesprimono questo enzima, al punto da essere stato proposto come bersaglio farmacologico in diverse neoplasie, dimostrando in vitro ed in vivo l'efficacia di tale approccio in studi di fase I e II.³⁰²⁻³⁰⁶

NAMPT può essere secreto da numerose cellule in particolare adipociti, epatociti, cardiomiociti, cellule endoteliali e cellule immunitarie e può agire come una citochina extracellulare (eNAMPT, visfatina o fattore di potenziamento delle colonie di cellule pre-B, PBEF). È stato dimostrato che esiste un processo secretorio positivo regolato, sebbene l'esatto meccanismo di rilascio sia attualmente in fase di studio. NAMPT sembrerebbe detenere un ruolo immunomodulante esercitando un effetto pro-infiammatorio diretto su macrofagi e favorendo la chemotassi dei monociti.^{307,308}

Numerosi studi in vitro hanno dimostrato che linee cellulari tumorali di tumori solidi e del sistema emopoietico sono responsabili di una aumentata secrezione di NAMPT.^{309,310} Tuttavia, sorprendentemente, la possibilità che eNAMPT può essere secreto attivamente da tumori in vivo è stato formalmente oggetto di un esiguo numero di studi presenti in letteratura, anche alla luce del fatto che le concentrazioni sieriche e/o plasmatiche di NAMPT sono risultate elevate in pazienti affetti da neoplasie solide quali carcinoma gastrico, carcinoma del colon-retto e neoplasie del sistema nervoso centrale, con riscontro di una correlazione positiva con lo stadio di patologia ed è stato descritto come fattore predittivo di mortalità in pazienti affetti da carcinoma esofageo.³¹⁰⁻³¹²

Studi in vitro condotti nelle ultime decadi hanno evidenziato che linee cellulari di melanoma sovraesprimono NAMPT, probabilmente indipendentemente dalla necessità di far fronte ai bisogni energetici delle cellule tumorali, suggerendo pertanto un ruolo differente di questa proteina nell'ambito della crescita e progressione tumorale.³¹²⁻³¹³

Il nostro studio ha evidenziato una aumentata espressione nel tessuto adiposo sottocutaneo di NAMPT nei melanomi avanzati appartenenti allo stato patologico II-IV rispetto ai melanomi sottili e ai controlli. L'espressione di NAMPT è risultata inoltre positivamente correlata con 2 fattori prognostici analizzati, ovvero lo spessore di Breslow ed il livello di Clark confermando una associazione di espressione con la severità di patologia.

Come noto, il metabolismo della nicotinamide adenina dinucleotide (NAD), un cofattore redox essenziale necessario per la respirazione mitocondriale e una molecola di segnalazione, viene alterato durante il processo di carcinogenesi.³¹⁴ Anche se il NAD può essere generato attraverso diverse vie metaboliche, l'aumento della produzione di NAD nel melanoma dipende esclusivamente dall'attività della NAMPT che appare pertanto come l'enzima limitante la velocità nella sintesi del NAD dalla nicotinamide.^{315,316} Studi in vivo più recenti condotti su modelli murini di melanoma B16 hanno inoltre messo in luce come le cellule tumorali stesse di melanoma rilascino NAMPT il quale sembrerebbe agire con un effetto sia autocrino che paracrino sul microambiente tumorale circostante (incluso il tessuto adiposo peritumorale).

Collateralmente è stato dimostrato che la somministrazione intracerebroventricolare di NAMPT induce una sindrome simile alla cachessia nei topi suggerendo che l'NAMPT tumorale possa avere un ruolo sistemico ancora più importante ancora da delineare.³¹⁷

E' stato inoltre dimostrato che la diminuzione dei livelli di NAMPT rallenta in maniera significativa la crescita delle cellule B16 impiantate in modelli murini, suggerendo una possibile applicazione in termini di strategia terapeutica di target therapy aventi come bersaglio molecolare proprio NAMPT.³¹⁸

Proprio in relazione alle terapie a bersaglio molecolare è recentemente emerso che l'espressione di NAMPT sembrerebbe implicata nei meccanismi di resistenza agli inibitori di BRAF/MEK (BRAFi/MEKi). Il melanoma mutato da BRAF contiene livelli più elevati di NAD, che diminuiscono drasticamente in risposta al trattamento con BRAFi / MEKi, ed aumentano nelle cellule resistenti a BRAFi.^{316, 318}

Audrito et al. hanno dimostrato infatti che NAMPT rappresenta un fattore trainante lo sviluppo della resistenza agli BRAFi. L'espressione NAMPT nelle linee cellulari di melanomi BRAF-mutati infatti si associa ad una maggiore produzione di energia, attivazione di MAPK, capacità di formazione di colonie e quindi di promozione della tumorigenicità in vivo. Inoltre, le cellule che sovraesprimono NAMPT sono caratterizzate da un fenotipo invasivo a livello mesenchimale, up-regolando l'espressione di ZEB1 e TWIST, due fattori di trascrizione che guidano il processo di transizione epiteliale-mesenchimale (EMT). Di concerto è stato riscontrato un aumentata produzione di NAMPT proprio nelle linee cellulari che hanno dimostrato resistenza farmacologica ai BRAFi. Il meccanismo esatto della resistenza farmacologica non è stato chiarito seppur sembrerebbero essere coinvolti da un lato la sovraregolazione di ABCC1 / MRP1 e la proliferazione di cellule CD133-positive.³¹⁸

Dati interessanti emergono da recenti lavori incentrati sull'uso degli inibitori di NAMPT in particolare proprio nel trattamento del melanoma cutaneo. E' stato recentemente riportato che gli inibitori di NAMPT sono in grado di stimolare l'attivazione dell'immunità antitumorale specifica e migliorare l'azione antitumorale svolta dagli inibitori del checkpoint immunitario.³¹⁹ Travelli et al. ha inoltre dimostrato che tali effetti sono conseguenza dell'azione di NAMPT sul microambiente tumorale e non direttamente sulle cellule neoplastiche. Pertanto l'inibizione che NAMPT esercita sulla crescita tumorale e sulla formazione di metastasi è indipendente da un effetto sul tumore stesso.³²⁰

Inoltre gli inibitori del NAMPT aumentano l'efficacia antitumorale degli inibitori del checkpoint immunitario cioè l'anticorpo contro PD-1.^{321,322} Questa scoperta modifica sostanzialmente il paradigma dell'uso degli inibitori NAMPT nel melanoma, che sembrerebbero pertanto anche in

grado di agire efficacemente anche sul sistema immunitario e di lavorare in maniera sinergica ai farmaci immunoterapici.

In aggiunta a quanto già riportato, la sovraespressione di NAMPT è stata associata ad un aumentata stimolazione della transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) ed è inoltre coinvolta nell'angiogenesi tumorale.³²² Ciò è supportato da un recente lavoro dimostrante che FK866, ovvero il primo inibitore nanomolare specifico di NAMPT, è in grado di inibire l'EMT dose-dipendente nell'epatocarcinoma.^{323,324}

Il nostro studio ha evidenziato una aumentata espressione di NAMPT a livello del tessuto adiposo peritumorale nei melanomi avanzati appartenenti allo stadio patologico II-IV rispetto ai melanomi sottili e ai controlli. L'espressione di NAMPT è risultata inoltre positivamente correlata con 2 fattori prognostici analizzati, ovvero lo spessore di Breslow ed il livello di Clark confermando una associazione di espressione con la severità di patologia.

L'espressione in vivo su tessuto sottocutaneo peritumorale non era stata descritta in precedenza e comunque conferma quanto presente in letteratura circa il fatto che risulta maggiormente espressa nel microambiente di lesioni melanomatose avanzate delineando un fenotipo caratterizzato da maggiore aggressività biologica e confermando quanto presente e dimostrato in vitro in letteratura.

Le chemochine angiogeniche, CXCL1, CXCL2 e CXCL3, sono state originariamente identificate da supernatanti di colture di linee cellulari di melanoma e sono altamente espresse nel melanoma umano.³²⁵⁻³²⁷ E' stato dimostrato in modelli murini che una riduzione e/o l'assenza di CXCL1, CXCL2 o CXCL3 nell'ospite si associa ad una significativa riduzione dell'angiogenesi e crescita del tumore.^{326,327} Il recettore delle chemochine, CXCR2, è responsabile anche dell'attività angiogenica mediata da queste chemochine.³²⁸ Una mutazione puntiforme in CXCR2 si traduce in una segnalazione costitutivamente attivata che promuove la trasformazione cellulare in senso neoplastico.³²⁹

CXCL1 è una chemochina che attraverso l'interazione con CXCR2 promuove l'angiogenesi e regola il reclutamento di neutrofili e basofili nei processi di infiammazione.^{330,331} Nei tumori solidi, l'aumento dell'espressione di CXCL1 o CXCR2 è spesso associato al reclutamento dei neutrofili e quindi alla flogosi tumorale, alla recidiva e alla progressione di malattia.

Il ruolo di CXCL1 è stato meglio caratterizzato nel melanoma, dove originariamente è stata identificata come proteina dell'attività stimolatrice della crescita del melanoma.³²⁵ La sovraespressione di CXCL1 è responsabile della trasformazione dei melanociti murini immortalati attraverso meccanismi dipendenti da RAS, consentendo la formazione di tumori in topi nudi e SCID.³³² La neutralizzazione dell'anticorpo CXCL1 o il knockdown siRNA di

CXCL1 nei melanociti aumenta l'apoptosi delle cellule tumorali ed inibisce la crescita e l'invasione del tumore.³³³ In vitro, CXCL1 attraverso CXCR2 è responsabile dell'induzione della crescita, della motilità e dell'invasività di varie linee cellulari di neoplasie, tra cui: carcinoma della mammella, carcinoma ovarico, carcinoma polmonare, carcinoma esofageo e melanoma. Queste attività cellulari sono regolate attraverso un insieme comune di percorsi tra cui: NF- κ B, Ras, MAPK e AKT. Questi studi indicano che CXCL1 collabora con driver oncogeni o perdita di soppressori tumorali per promuovere lo sviluppo del tumore.³³²⁻³³⁵

Da allora gli studi si sono susseguiti dimostrando un ruolo cardine della via di segnalazione di CXCL1 / CXCR2 nella regolazione del tumore primario e del processo di metastatizzazione. Questi studi indicano che l'attivazione della via di segnale CXCL1 / CXCR2 nelle cellule di carcinoma mammario è coinvolta nella regolazione della crescita del tumore e nell'invasione metastatica in particolare di polmone e ossa. Oltre alla CXCL1 sembrerebbe espletare un ruolo di primo ordine nella patogenesi del melanoma anche la chemochina CXCL8, in particolare nel processo di angiogenesi, proliferazione, ed invasione neoplastica.³³⁶

Una correlazione diretta tra i livelli di CXCL8 e CXCR2 e l'aggressività della patologia melanomatosa è stata riportata recentemente in letteratura.³³⁷

Nel nostro studio non è emersa una differenza statisticamente significativa nell'espressione di CXCL8 seppur presente tra una maggiore espressione di CXCL8 nei melanomi rispetto alle lesioni controllo analizzate.

Infine nel nostro studio per quanto concerne l'espressione di TNF alpha e IL-6, sono emersi dati contrastanti, che appaiono comunque confermare l'incertezza presente sull'argomento in letteratura.³³⁸ Le cellule del melanoma sembrano esprimere livelli variabili di citochine e recettori delle citochine in diversi stadi della progressione della malattia. L'interleuchina (IL)-1 β , IL-6 e IL-8, ad esempio, sono note per essere importanti fattori di proliferazione cellulare e progressione del melanoma.^{339,340} I nevi e i melanomi sottili (meno di <1 mm di spessore) esprimono generalmente bassi livelli di IL-8, fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α), fattore di crescita trasformante beta (TGF- β) e c-kit. Al contrario, i melanomi in stadio avanzato (> 1 mm di spessore) mostrano una sovraregolazione di IL-1 α , IL-1 β , IL-8, TNF- α , TGF- β e fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi (GM-CSF). Il TGF- β è considerato un marker della diffusione metastatica del melanoma.^{341,342} Un ulteriore studio in un modello murino mostra che i melanomi più aggressivi esprimono livelli più bassi di TNF- α e altre citochine infiammatorie, come determinato dalle analisi qRT-PCR, confermando il ruolo controverso precedentemente riportato del TNF- α .^{343,344} Ciò suggerisce che lo sviluppo e la progressione del melanoma è un processo complesso basato su un'interazione ben organizzata della capacità di

proliferazione intrinseca combinata alla risposta immunitaria e angiogenica, come azione coordinata di diversi tipi di cellule. Le citochine che controllano l'infiammazione e le cellule immunitarie possono influenzare la risposta immunitaria dell'ospite e le cellule di melanoma possono attivare e/o rimodellare l'ambiente circostante per secernere fattori che mediano la progressione metastatica. Inoltre, le cellule di melanoma possono secernere modulatori inibitori e quindi arrestare il riconoscimento e la maturazione delle cellule immunitarie effettrici o altri segnali che influenzano il microambiente delle cellule tumorali.^{345,346} Pertanto, diversi meccanismi differenti controllano la capacità del melanoma cutaneo di crescere, invadere e disseminare rapidamente metastasi in altri tessuti e organi. Ciò sottolinea pertanto l'importanza del microambiente e della risposta immunitaria nello sviluppo e nella prognosi di tale neoplasia cutanea.

CONCLUSIONI

Il presente studio si è posto l'obiettivo di estendere ed unificare studi promettenti ma mai eseguiti in vivo e nell'uomo, ad un campione umano, proponendo peraltro una estensione del nuovo concetto di tessuto adiposo inteso come organo, analizzandone le implicazioni sul profilo infiammatorio e di stress ossidativo/attività metabolica nel melanoma cutaneo. Ci si attende che tali risultati, da ampliare da un punto di vista di casistica clinica e da integrare con lo studio dell'espressione a livello circolatorio dei livelli sierici delle stesse e a livello immunohistochimico (in corso) per una eventuale correlazione sistemica, possano essere utili in un approccio sia di prevenzione che di cura sempre più multimodale and *tailored* di tale patologia. I dati più promettenti anche sulla base di quanto presente in letteratura sono relativi l'espressione di NAMPT; i nostri risultati supportano infatti l'idea di considerare NAMPT come nuovo target terapeutico utilizzabile nel management del melanoma. In passato, gli inibitori del NAMPT (NAMPTi) hanno mostrato una modesta attività antitumorale principalmente perché il blocco dell'NAMPT veniva aggirato biologicamente attraverso l'attivazione di altri percorsi biosintetici NAD, come quello regolato tramite NAPRT e NRK. Studi più recenti hanno però dimostrato che il trattamento di melanomi con NAMPTi può condurre ad un crash metabolico che riduce NAD e ATP, inducendo l'apoptosi in vitro e la regressione del tumore. È stato inoltre osservato che il knock-out di NAMPT nelle cellule induce una rapida morte cellulare, mentre il silenziamento incompleto porta ad una marcata inibizione della proliferazione e perdita di aggressività/invasività. Sono necessari ulteriori studi per confermare il potenziale terapeutico di questa combinazione di farmaci. Altrettanto interessante appare la possibilità di approfondire l'utilizzo a scopo diagnostico predittivo della valutazione di espressione di NAMPT a livello tumorale e nel tessuto adiposo peritumorale per poter anticipare l'esistenza di una possibile resistenza farmacologica nei pazienti con melanoma BRAF mutato.³¹⁸⁻³²¹

Nel complesso, i risultati preliminari di questo lavoro evidenziano che la sovraespressione di alcune adipochine e chemochine in particolare PAI1, NAMPT, LEP e CXCL1 non solo a livello della lesione melanomatosa ma anche nel tessuto adiposo peritumorale può rappresentare un evento chiave nella crescita e soprattutto nell'aggressività locale della neoplasia e apre pertanto l'ipotesi di un ruolo oncogenico diretto di queste molecole nella tumoregenesi del melanoma.

BIBLIOGRAFIA

1. Bologna J, Schaffer J, Cerroni L. *Dermatology*; 4th Edition, Ottobre 2017;
2. Robbins e Cotran, *Le basi patologiche delle malattie*, p1567 IX edizione 2015;
3. Bertolotto C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. *Scientifica* 12(2), 2013;
4. Silva HJ et al. Atypical mole syndrome and dysplastic nevi: identification of populations at risk for developing melanoma - review article. *Clinics*, 66(3):493-499, 2011;
5. Braeuer RR, Watson IR, Wu CJ, Mobley AK, Kamiya T, Shoshan E, Bar-Eli M. Why is melanoma so metastatic?. *Pigment cell & melanoma research*, 27: 19-36, 2013;
6. Newton-Bishop J.A. from Rook's textbook of dermatology, nine edition, p.2865; 2016
7. Murray C.S. et al. Thick melanoma, the challenge persists. *British journal of dermatology*, 152: 104-9, 2005;
8. Popova T. et al, Germline BAP-1 mutation predispose to RCC. *The American journal of human genetics*, 92: 974-980, 2013;
9. L.Li, S.J.Plummer, C. L.Thompson, T.C.Tucker, G.Casey. Association between Phosphatidylinositol 3-Kinase Regulatory Subunit p85A Met326Ile Genetic Polymorphism and Colon Cancer Risk. *Clin Cancer Res*, 14(3): 633-637, 2008;
10. Q.Li, J.Yang, Q.Yu, et al. Associations between Single-Nucleotide Polymorphisms in the PI3K-PTEN-AKT-mTOR Pathway and Increased Risk of Brain Metastasis in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 19: 6252-6260, 2013;
11. Held L, Eigentler TK, Meier F, Held M, Röcken M, Garbe C, Oncogenetics of melanoma: basis for molecular diagnostics and therapy. *Journal of the german society of dermatology*, 9: 510-516, 2011;
12. Bolick NL, Geller AC. Epidemiology of Melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2021 Feb;35(1):57-72.
13. GLOBOCAN 2020, estimated cancer incidence, mortality and prevalence, IARC;
14. I numeri del cancro in Italia 2019, AIOM-AIRTUM;
15. Testori A, Soteldo J et al., Cutaneous melanoma in the elderly. *Melanoma research*, 19: 125-134, 2009;
16. Leite Viana AC, Gontijo B, et al., Giant congenital melanocytic nevus. *An.Bras.Dermatol.*, 88(6): 863-78, 2013;
17. AIOM, linee guida melanoma 2020, ed.Ottobre 2020;
18. Liu R et al., meta-analysys of the relationship between parkinson's disease and melanoma. *Neurology*, 76: 2002-2009, 2011;
19. Bruce S Mackie et al. Melanoma and dietary lipids, *Nutrition and cancer*, 9: 219-226, 1987;
20. Sergentanis TN et al. Obesity and risk of malignant melanoma: a meta-analysis of cohort and case-control studies. *Eur.J.Cancer*, 49(3):642-57, 2013;
21. Gogas H et al. Melanoma risk in association with serum leptine levels and lifestyle parameters: a case-control study. *Annals of oncology*, 19: 384-389, 2008;

22. Jing Zhou et al. Melanoma incidence rates among whites in the U.S. military. *Cancer epidemiol.Biomarkers prevention*, 20(2), 318-23, 2010;
23. Ward EM, Burnett CA, et al. Industries and cancer. *Cancer Causes Control*, 8:356–70, 1997;
24. Dahlke et al. Systematic review of melanoma incidence and prognosis in solid organ transplant recipients. *Transplantation research*, 3:10, 2014;
25. Wen-Quing Li, Abrar A. Qureshi, et al. Sildenafil use and increased risk of incident melanoma in US men: a prospective cohort study. *JAMA Intern.Med.*, 174(6): 964–970, 2014;
26. Basi scientifiche per la definizione di linee-guida in ambito clinico per il Melanoma cutaneo, febbraio 2012, ISS;
27. Chiarugi A et al. Sensitivity to ultraviolet B is a risk factor for cutaneous melanoma in a Mediterranean population: results from an Italian case-control study. *Clin.Exp.Dermatol.*, 34(1): 8-15, 2009;
28. Olsen CM, Carroll HJ, Whiteman DC. Estimating the attributable fraction for melanoma: a meta-analysis of pigmentary characteristics and freckling. *Int J Cancer*, 127(10):2430-45, 2010;
29. Echeverria B et al. Indicators for the total number of melanocytic naevi: an adjunct for screening campaigns. Observational study on 292 patients. *British journal of dermatology*, 170: 144-149, 2014;
30. Olsen M et al. Estimating the Attributable Fraction for Cancer: A Meta-analysis of Nevi and Melanoma. *Cancer prevention research*, 3(2): 233-245, 2010;
31. Falchi S et al. Loci at 9p21 and 22q13 harbour alleles for development of cutaneous nevi and melanoma. *Nat Genet*, 41(8): 915–919, 2009;
32. Riegert-Johnson DL, Boardman LA, Hefferon T, et al. *Cancer Syndromes*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2009;
33. Kregel S et al. Melanoma risk in congenital melanocytic naevi: a systematic review. *British journal of dermatology*, 155: 1-8, 2006;
34. Udayakumar D et al. Genetic determinants of cutaneous melanoma predisposition. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 29: 190-195, 2010;
35. Hawryluk EB, Hensin T. Melanoma: clinical features and genomic insights. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4:a015388, 2014;
36. Goldstein AM et al. Genotype–phenotype Relationships in U.S.Melanoma-Prone Families With CDKN2A and CDK4 Mutations. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 92, No. 12: 1006-1010, June 21, 2000;
37. Hensin T et al. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes&development*, 26:1131–1155, 2012;
38. Demenais F, Mohamdi H, Chaudru V et al. the Melanoma Genetics Consortium, Association of MC1R Variants and Host Phenotypes With Melanoma Risk in CDKN2A Mutation Carriers: A GenoMEL Study. *J Natl Cancer Inst*, 102: 1568–1583, 2010;
39. Ching-Ni JN, Kim I, Piris A et al. Germline BAP1 Inactivation Is Preferentially Associated with Metastatic Ocular Melanoma and Cutaneous-Ocular Melanoma Families. *Plosone*, 7(4): e352, 2012;
40. Horn S et al. TERT Promoter Mutations in Familial and Sporadic Melanoma, *Science*, 339, 959-961, 2013;
41. Griewank KG, Murali R et al. TERT Promoter Mutations Are Frequent in Cutaneous Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma, *Plosone*, 8(11): 2013;
42. Franklin W et al. Highly Recurrent TERT Promoter Mutations in Human Melanoma. *Science*, 339: 957-959, 2013;

43. Latreille J et al. MC1R gene polymorphism affects skin color and phenotypic features related to sun sensitivity in a population of French adult women. *Photochem.Photobiol.*, 85(6): 1451-8, 2009;
44. M.Berwick et al. MITF E318K's effect on melanoma risk independent of, but modified by, other risk factors. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27: 485–488, 2014;
45. Yokoyama S. Woods S.L. et al., A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature*, 480: 99-105, 2011;
46. Guilherme F, Priscila D, Ramos C, et al. *Melanoma Genetics: From Susceptibility to Progression, Melanoma - From Early Detection to Treatment*, Dr. Ht Duc (Ed.), 2013;
47. Gandini S, Raimondi S et al. Vitamin D and skin cancer: A meta-analysis. *European journal of cancer*, 45: 634 –641, 2009;
48. Zeljic K, Kandolf-Sekulovic L, Supic G et al., Melanoma risk is associated with vitamin D receptor gene polymorphisms. *Melanoma research*, 24(3):273-9, 2014;
49. Ong EL et al. Differential risks of cancer types in people with Parkinson's disease: A national record-linkage study. *European journal of cancer*, 50(14): 2456–2462, 2014;
50. Bertoni JM, Arlette JP et al., Increased Melanoma Risk in Parkinson Disease. *Arch Neurol.*, 67(3): 347-352, 2010;
51. Gao X et al. Family history of melanoma and Parkinson disease risk. *Neurology*, 73:1286–1291, 2009;
52. Lee BR, Matsuo Y et al. Role of Ser129 phosphorylation of α -synuclein in melanoma cells. *Journal of Cell Science* 126 (2): 696-704, 2013;
53. Whiteman DC et al. Anatomic site, sun exposure and risk of cutaneous melanoma. *Journal of clinical oncology*, 24:3172-3177, 2006;
54. Brozyna A et al. Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma. *Expert Rev Dermatol.*, 2(4): 451–469, 2007;
55. Nelemans PJ et al. Effect of Intermittent Exposure to Sunlight on Melanoma Risk Among Indoor Workers and Sun-Sensitive Individuals. *Environmental health perspectives*, 101: 252-255, 1993;
56. Colantonio S et al. The association of indoor tanning and melanoma in adults: Systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol*, 70: 847-57, 2014;
57. Veierød MB et al, A Prospective Study of Pigmentation, Sun Exposure, and Risk of Cutaneous Malignant Melanoma in Women. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 95, No. 20, 1530-1538, 2003;
58. Denkins Y et al., Role of ω -3 polyunsaturated fatty acids on cyclooxygenase-2 metabolism in brain-metastatic melanoma. *Journal of lipid research*, 46: 1278-1284, 2005;
59. Sakai M. Arachidonic acid and cancer risk: a systematic review of observational studies. *BMC Cancer*, 12:606, 2012;
60. Martinez GL et al., Serum level changes of long chain-polyunsaturated fatty acids in patients undergoing periodontal therapy combined with one year of omega-3 supplementation: a pilot randomized clinical trial. *J Periodontal Implant Sci*, 44:169-177, 2014;
61. Rota M et al., Alcohol drinking and cutaneous melanoma risk: a systematic review and dose–risk meta-analysis, *British journal of dermatology*, 170: 1021–1028, 2014;
62. Amjadi J et al. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, Leptin promotes melanoma tumor growth in mice related to increasing circulating endothelial progenitor cells numbers and plasma NO production 30:21, 2011;

63. Nemazannikova N et al. Role of vitamin D metabolism in cutaneous tumour formation and progression. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65: 2–10, 2012;
64. Caini S et al. Vitamin D and melanoma and non-melanoma skin cancer risk and prognosis: A comprehensive review and meta-analysis. *European journal of cancer*, 50(15): 2649-2658, 2014;
65. Fortes C et al., A protective effect of the Mediterranean diet for cutaneous melanoma. *International Journal of Epidemiology*, 37:1018–1029, 2008;
66. Zhang Y-P, Chu R-X, Liu H. Vitamin A Intake and Risk of Melanoma: A Meta-Analysis. *PLoS ONE* 9(7): 2014;
67. Faisal R. et al. Melanoma in organ transplant recipients: incidence, outcomes, and management considerations. *Journal of skin cancer*, 2012: 404615, 2012;
68. Trunfio M, Ribero S, Bonora S, et al. Malignant Melanoma in People Living with HIV/AIDS: Can We Know More, Can We Do Better? *AIDS Rev.* 2019;21(2):65-75.
69. Zelin E, et al. E Melanoma in pregnancy: certainties unborn. *Melanoma Manag* 2020 Jul 30;7(3):MMT48.
70. Krone B, Kolmel KF, Grange JM et al. Impact of vaccinations and infectious diseases on the risk of melanoma evaluation of an EORTC casecontrol study. *Eur J Cancer*, 39: 2372-2378, 2003;
71. Gamba CA, Swetter SM et al. Aspirin is associated with lower melanoma risk among post-menopausal caucasian women: the women's health initiative. *Cancer*, 119(8), 2013;
72. Livingstone E et al. Statin use and its effect on all-cause mortality of melanomapatients: a population-based Dutch cohort study. *Cancer medicine*, 3(5): 1284–1293, 2014;
73. Koomen ER, Joosse A, et al. Is statin use associated with a reduced incidence , a reduced Breslow thickness or delayed metastasis of melanoma of the skin?. *Eur J Cancer*, 43: 2580–2589, 2007;
74. McCourt C, Coleman HG et al. Beta-blocker usage after malignant melanoma diagnosis and survival: a population-based nested case–control study. *British journal of dermatology*, 170: 930-938, 2014;
75. Lemeshow S, ørnsen HT, Phillips G et al. b-Blockers and servival among Danish patients with malignant melanoma: a populationbased cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20:2273–9, 2011;
76. Emmert S, Kraemer KH. Do Not Underestimate Nucleotide Excision Repair: It Predicts Not Only Melanoma Risk but Also Survival Outcome, *Journal of Investigative Dermatology*, 133: 1713–1717, 2013;
77. Palmieri G, Colombino M, Sini MC et al. Targeted Therapies in Melanoma: Successes and Pitfalls, *Melanoma - From Early Detection to Treatment*, Dr. Ht Duc (Ed.), 2013;
78. Hodis E et al., A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. *Cell*, 150(2): 251–263, 2012;
79. Dahl C, Guldborg P. The genome and epigenome of malignant melanoma, *APMIS* 115: 1161–1176, 2007;
80. Yajima I et al, RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in MalignantMelanoma Progression and Therapy, *Hindawi Publishing Corporation Dermatology Research and Practice*, Volume 13,145.3,2012;
81. Russo AE et al. Melanoma: Molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review). *International journal of oncology*, 34: 1481-1489, 2009;
82. Menzies AM et al. Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma, *Drug Design. Development and Therapy* 2012;6 391–405;
83. Levy C et al. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in Molecular Medicine*, 12(9): 406-414, 2006;

84. Garg M. Epithelial-mesenchymal transition - activating transcription factors - multifunctional regulators in cancer. *World J Stem Cells*, 5(4): 188-195, 2013;
85. Yadav L et al., Matrix Metalloproteinases and Cancer - Roles in Threat and Therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15(3): 1085-1091, 2014;
86. Ria R et al., Angiogenesis and Progression in Human Melanoma. *Dermatology Research and Practice* Volume 16,152.2 2010;
87. Kim JE et al. Heterogeneity of expression of epithelial–mesenchymal transition markers in melanocytes and melanoma cell lines. *Frontiers in genetics*, 4: 97, 2013;
88. Yemlich Y, Greenberg E, Ortenberg R et al., MicroRNA-mediated loss of ADAR1 in metastatic melanoma promotes tumor growth. *J Clin Invest.*,123(6): 2703–2718, 2013;
89. Tomaselli S, Bonamassa B et al., ADAR Enzyme and miRNA Story: A Nucleotide that Can Make the Difference. *International journal of molecular sciences*, 14, 22796-2816; 2013;
90. Kashani-Sabet M. Molecular markers in melanoma. *British journal of dermatology*, 170: 31-35, 2014;
91. Curtin JA et al., Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *New England journal of medicine*, 353(20): 2135-2147, 2005;
92. Nissan MH. Loss of NF1 in Cutaneous Melanoma Is Associated with RAS Activation and MEK Dependence. *Cancer Res*; 74(8): 2340-2350, 2014;
93. Lázár V et al., Characterization of candidate gene copy number alterations in the 11q13 region along with BRAF and NRAS mutations in human melanoma. *Modern pathology*, 22, 1367–1378, 2009;
94. Fedorenko IV et al., Beyond BRAF: where next for melanoma therapy?. *British journal of cancer*, 1–10,1038 ,2014;
95. Scolyer RA at al., Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Molecular oncology*, 5: 124-136, 2011;
96. Koopmans AE. Patient survival in uveal melanoma is not affected by oncogenic mutations in GNAQ and GNA11. *British journal of cancer*, 109: 493-496, 2013;
97. Noto G. On the clinical significance of cutaneous melanoma’s precursors. *Indian Dermatology Online Journal*, 3: 83-88, 2012;
98. Nikfarjam J. Congenital Melanocytic Nevi and the Risk of Malignant Melanoma: Establishing a Guideline for Primary-Care Physicians. *EJBM*, 27(2):59-66, 2011;
99. Goldstein AM, Tucker MA. Dysplastic Nevi and Melanoma. *Epidemiol Biomarkers Prev*, 22(4): 528–32, 2013;
100. Skender-Kelnenas TM et al. Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma?. *J Am Acad Dermatol.*, 33(6): 1000-7, 1995;
101. Goodson AG, Grossman D. Strategies for early melanoma detection: approaches to the patient with nevi. *J Am Acad Dermatol.*, 60(5): 719–738, 2009;
102. Bono A, Bartoli C et al. Micro-melanoma detection. A clinical study on 22 cases of melanoma with a diameter equal to or less than 3mm. *Tumori*, 90: 128-131, 2004;
103. Situm M et al. Melanoma – Clinical, Dermatoscopic, and Histopathological Morphological Characteristics. *Acta Dermatovenerol Croat*, 22(1):1-12, 2014;
104. Greenwald HS. Superficial spreading and nodular melanoma are distinct biological entities: a challenge to the linear progression model. *Melanoma Res.*, 22(1): 1–8, 2012;

105. Barnhill RL, Gupta K. Unusual variants of malignant melanoma. *Clinics in Dermatology*, 27: 564–587, 2009;
106. Park HS. Acral Lentiginous Melanoma in Situ: A Diagnostic and Management Challenge. *Cancers*, 2: 642-652, 2010;
107. Tong X, Qu X, Wang M. A Four-Gene-Based Prognostic Model Predicts Overall Survival in Patients With Cutaneous Melanoma. *Front Oncol* 2021 Mar 24;11:639874.
108. Ivan D, Prieto VG. An Update on Reporting Histopathologic Prognostic Factors in Melanoma. *Arch Pathol Lab Med*, 135: 825-829, 2011;
109. Emily Z, Keung E, Jeffrey E. Gershenwald. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2018 August ; 18(8): 775–784.
110. Wang L, Chen F, et al. Gene expression and immune infiltration in melanoma patients with different mutation burden. *BMC Cancer* 2021 Apr 9;21(1):379.
111. Requena C, Botella-Estrada R, V.Traves, et al. Problems in Defining Melanoma Regression and Prognostic Implication. *Actas Dermosifiliogr.*, 100: 759-66, 2009;
112. Roncati I, Piscioli F. The Histogenetic Model of Melanoma in the Modern Era of Personalized Medicine. *Acta Dermatovenerol Croat* 2020 Dec;28(7):236-237.
113. Maurichi A, Miceli R, Camerini T et al. Prediction of survival in patients with thin melanoma: results from a multi-istitution study. *Journal of clinical oncology*, 32(23): 2479-2485, 2014;
114. Pastushenko I, Vermeulen PB, Carapeto FJ, et al. Blood microvessel density, lymphatic microvessel density and lymphatic invasion in predicting melanoma metastases: systematic review and meta-analysis. *British Journal of Dermatology*, 170: 66–77, 2014;
115. Balch CM, Gershenwald JE et al. Multivariate Analysis of Prognostic Factors Among 2,313 Patients With Stage III Melanoma: Comparison of Nodal Micrometastases Versus Macrometastases. *Journal of clinical oncology*, 28(14): 2452-2459, 2010;
116. Balch CM, Soong S, Gershenwald JE, et al. Age as a Prognostic Factor in Patients with Localized Melanoma and Regional Metastases. *Ann.Surg.Oncol.*, 20(12): 3961–3968, 2013;
117. Vereecken P. Serum Markers in Clinical Management of Malignant Melanoma, *Highlights in Skin Cancer*, Dr. Pierre Vereecken (Ed.), ISBN: 978-953-51-1073-6, InTech, 2013;
118. Picard M et al. Is BRAF a prognostic factor in stage III skin melanoma? A retrospective study of 72 patients after positive sentinel lymph node dissection. *British journal of dermatology*, 171(1): 108–114, 2014;
119. Jakob JA, Bassett Jr RL, et al. NRAS Mutation Status is an Independent Prognostic Factor in Metastatic Melanoma. *Cancer*, 118(16): 4014–4023, 2012;
120. Shan-Shan J, De-Sheng w et al. Galectin-3 is associated with a poor prognosis in primary hepatocellular carcinoma. *Journal of Translational Medicine*, 12:273, 2014;
121. Comodo AN, Lacerda Bachi AL et al. Galectin-3 expression favors metastasis in murine melanoma. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4: 55-62, 2013;

122. Dange MC, Srinivasan N, More SK et al. Galectin-3 expressed on different lung compartments promotes organ specific metastasis by facilitating arrest, extravasation and organ colonization via high affinity ligands on melanoma cells, *Clin Exp Metastasis.*, 31(6):661-73, 2014;
123. Sun V, Zhou WB, Majid S et al. MicroRNA-mediated regulation of melanoma. *British Journal of Dermatology*, 171: 234–241, 2014;
124. Khosravi S. et al. Role of EIF5A2, a downstream target of Akt, in promoting melanoma cell invasion. *British Journal of Cancer*, 110: 399–408, 2014;
125. DeSemir D. et al. Pleckstrin homology domain-interacting protein (PHIP) as a marker and mediator of melanoma metastasis, *PNAS*, 109(18): 7067–7072, 2012;
126. Gerber AL et al. High expression of FOXP3 in primary melanoma is associated with tumour progression. *British journal of dermatology*, 170: 103–109, 2014;
127. Rigel DS, Russak J, Friedman R. The Evolution of Melanoma Diagnosis: 25 Years Beyond the ABCDs. *Cancer J Clin*, 60: 301–316, 2010;
128. Trindade FM, Pires ML. Dermoscopic evaluation of superficial spreading melanoma. *An Bras Dermatol* 2021;96(2):139-147.
129. Moloney FJ, Guitera P, Coates E et al. Detection of Primary Melanoma in Individuals at Extreme High Risk A Prospective 5-Year Follow-Up Study. *JAMA Dermatol.*, 150(8): 819-27, 2014;
130. Alarcon I, Carrera C, Palou J et al. Impact of in vivo reflectance confocal microscopy on the number needed to treat melanoma in doubtful lesions. *British Journal of Dermatology*, 170: 802–808, 2014;
131. Wortsman X. Sonography of the Primary Cutaneous Melanoma: A Review. *Radiology Research and Practice*, Volume 201, 814396, 2012;
132. NCCN Guidelines Insights: Melanoma: Cutaneous, Version 2.2021. *J Natl Compr Canc Netw* 2021 1;19(4):364-376.
133. Bund V, Lecoindre L, Akladios C. The saga of lymph node surgery in malignant melanoma: a history repeating itself in gynecologic oncology. *Chin Clin Oncol* 2021 23;cco-20-227.
134. Morton DL, Thompson JF, Cochran, AJ et al. Final Trial Report of Sentinel-Node Biopsy versus Nodal Observation in Melanoma. *N Engl J Med.*, 370(7): 599–609, 2014;
135. Coleman J, Andrew A et al., Optimizing Regional Infusion Treatment Strategies for Melanoma of the Extremities. *Expert review of anticancer therapy* 9.11 (2009): 1599. PMC, 2009;
136. Michielin O, Van Akkooi ACJ, Ascierto P et al. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2019 1;30(12):1884-1901.
137. Cinti S. The adipose organ. Milano: Kurtis, 1999.
138. Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab. Disord* 1998; 22: 1145-58.
139. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 2001; 60: 329-39.
140. Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 2006; 55: 1537-45.

141. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005;46:2347-55.
142. Cinti, S. Organo endocrino adiposo 2020: stato dell'arte. *L'Endocrinologo* 21, 270–276. 2020
143. Oh DK, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin in health and disease. *Diabetes Obes Metab* 2007; 9: 282-9.
144. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006; 116: 1784-92.
145. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 2004; 291: 1730-7.
146. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92:347-55.
147. Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(10):1533-41.
148. Giralt M, Cereijo R, Villarroya F. Adipokines and the Endocrine Role of Adipose Tissues. *Handb Exp Pharmacol*. 2016;233:265-82.
149. Raucci R, Rusolo F, Sharma A, Colonna G, Castello G, Costantini S. Functional and structural features of adipokine family. *Cytokine*. 2013 Jan;61(1):1-14
150. Zhang Y, Chua S Jr. Leptin Function and Regulation. *Compr Physiol*. 2017;8(1):351-369.
151. Banks WA. The many lives of leptin, *Peptides*, 25, 331-338, 2004.
152. Unger RH. The hyperleptinemia of obesity-regulator of caloric surpluses. *Cell*, 117, 145-151, 2004.
153. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395,763-770, 1998.
154. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 11,327-332, 2000.
155. Mancuso, P. The role of adipokines in chronic inflammation. *Immunotargets Ther*. 2016, 5, 47–56.
156. Wilkinson M, Morash B, Ur E. The brain is a source of leptin. *Frontiers of hormone research*, 26,106-25, 2000.
157. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*. 1997;3(9):1029-33.
158. Lammert A, Kiess W, Bottner A, Glasow A, Kratzsch J. Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochemical and biophysical research communications*, 283, 982–988, 2001.

159. Tartaglia LA, Dambiski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richard GJ, Campfield LA, Cark FT, Deeds J. Identification and expression cloning of leptin receptor, OB-R, *Cell*, 83, 1263-1271, 1995.
160. Pan WW, Myers MG Jr. Leptin and the maintenance of elevated body weight. *Nat Rev Neurosci*. 2018 Feb;19(2):95-105.
161. Triantafyllou GA, Paschou SA, Mantzoros CS. Leptin and Hormones: Energy Homeostasis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2016;45(3):633-45.
162. Bjørnbæk C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent progress in hormone research*, 2004., 59, 305-331.
163. Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, Nicola NA, Alexander WS, Hilton DJ. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(25):14564-8.
164. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(5):371-9.
165. Gamba M, Pralong FP. Control of GnRH neuronal activity by metabolic factors: the role of leptin and insulin. *Mol Cell Endocrinol*. 2006;254-255:133-9.
166. Poeggeler B, Schulz C, Pappolla MA, Bodó E, Tiede S, Lehnert H, Paus R. Leptin and the skin: a new frontier. *Exp Dermatol*. 2010;19(1):12-8.
167. Lee M, Lee E, Jin SH, Ahn S, Kim SO, Kim J, Choi D, Lim KM, Lee ST, Noh M. Leptin regulates the pro-inflammatory response in human epidermal keratinocytes. *Arch Dermatol Res*. 2018;310(4):351-362.
168. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem*. 1996 Oct;120(4):803-12.
169. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*. 2001;50:2094–2099.
170. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995;270(45):26746-9.
171. Piñeiro R, Iglesias MJ, Gallego R, Raghay K, Eiras S, Rubio J, Diéguez C, Gualillo O, González-Juanatey JR, Lago F. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett*. 2005;579(23):5163-9.
172. Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;323(2):630-5.
173. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006;116:1784–1792.

174. Inadera H. The usefulness of circulating adipokine levels for the assessment of obesity-related health problems. *International journal of medical sciences*, 29;5(5):248-62, 2008.
175. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem*. 2002;277(29):25863-6
176. Achari AE, Jain SK. Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction. *Int J Mol Sci*. 2017;18.
177. Katira A, Tan PH. Evolving role of adiponectin in cancer controversies and update. *Cancer Biol Med*. 2016;13:101–119.
178. Dalamaga M, Diakopoulos KN, Mantzoros CS. The role of adiponectin in cancer: a review of current evidence. *Endocr Rev*. 2012;33:547–594.
179. Orgel E, Mittelman SD. The links between insulin resistance, diabetes, and cancer. *Curr Diab Rep*. 2013;13:213–222.
180. Tura A, Thieme C, Brosig A, Merz H, Ranjbar M, Vardanyan S, Zuo H, Maassen T, Kakkassery V, Grisanti S. Lower Levels of Adiponectin and Its Receptor AdipoR1 in the Uveal Melanomas With Monosomy-3. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2020;61(5):12.
181. Sevim DG, Kiratli H. Serum adiponectin, insulin resistance, and uveal melanoma: clinicopathological correlations. *Melanoma Res*. 2016;26:164–172.
182. Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, Nelson C, Lowman HB, Wright BD, Skelton NJ, Frantz GD, Tumas DB, Peale FV Jr, Shelton DL, Hébert CC. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J*. 2000;19(15):4046-55
183. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409(6818):307-12.
184. Patel SD, Rajala MW, Rossetti L, Scherer PE, Shapiro L. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science*. 2004;304(5674):1154-8.
185. Kusminski CM, McTernan PG, Kumar S. Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109(3):243-56.
186. Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, Ebenbichler CF, Tilg H, Patsch JR. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;309(2):286-90.
187. Lehrke M, Reilly MP, Millington SC, Iqbal N, Rader DJ, Lazar MA. An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *PLoS medicine*, 1(2):e45, 2004.
188. Jung HS, Park KH, Cho YM, Chung SS, Cho HJ, Cho SY, Kim SJ, Kim SY, Lee HK, Park KS. Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2006; 69(1):76-85.

189. Harrison WJ, Bull JJ, Seltmann H, Zouboulis CC, Philpott MP. Expression of lipogenic factors galectin-12, resistin, SREBP-1, and SCD in human sebaceous glands and cultured sebocytes. *J Invest Dermatol.* 2007;127(6):1309-17.
190. Malvi P, Chaube B, Pandey V, Vijayakumar MV, Boreddy PR, Mohammad N, Singh SV, Bhat MK. Obesity induced rapid melanoma progression is reversed by orlistat treatment and dietary intervention: role of adipokines. *Mol Oncol.* 2015;9(3):689-703.
191. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science.* 2005;307(5708):426-30.
192. Divella R., De Luca R., Abbate I., Naglieri E., Daniele A. Obesity and cancer: The role of adipose tissue and adipo-cytokines-induced chronic inflammation. *J. Cancer.* 2016;7:2346–2359.
193. Dahl T.B., Holm S., Aukrust P., Halvorsen B. Visfatin/NAMPT: A multifaceted molecule with diverse roles in physiology and pathophysiology. *Annu. Rev. Nutr.* 2012;32:229–243.
194. Hung AC, Lo S, Hou MF, Lee YC, Tsai CH, Chen YY, Liu W, Su YH, Lo YH, Wang CH, Wu SC, Hsieh YC, Hu SC, Tai MH, Wang YM, Yuan SS. Extracellular Visfatin-Promoted Malignant Behavior in Breast Cancer Is Mediated Through c-Abl and STAT3 Activation. *Clin Cancer Res.* 2016;22(17):4478-90.
195. Shackelford RE, Mayhall K, Maxwell NM, Kandil E, Coppola D. Nicotinamide phosphoribosyltransferase in malignancy: a review. *Genes Cancer.* 2013;4(11-12):447-56.
196. Kanda N, Hau CS, Tada Y, Tatsuta A, Sato S, Watanabe S. Visfatin enhances CXCL8, CXCL10, and CCL20 production in human keratinocytes. *Endocrinology.* 2011;152(8):3155-64.
197. Fan Y, Meng S, Wang Y, Cao J, Wang C. Visfatin/PBEF/Nampt induces EMMPRIN and MMP-9 production in macrophages via the NAMPT-MAPK (p38, ERK1/2)-NF-κB signaling pathway. *Int J Mol Med.* 2011; 27(4):607-15.
198. Managò A, Audrito V, Mazzola F, Sorci L, Gaudino F, Gizzi K, Vitale N, Incarnato D, Minazzato G, Ianniello A, Varriale A, D'Auria S, Mengozzi G, Politano G, Oliviero S, Raffaelli N, Deaglio S. Extracellular nicotinate phosphoribosyltransferase binds Toll like receptor 4 and mediates inflammation. *Nat Commun.* 2019;10(1):4116.
199. Travelli C, Colombo G, Mola S, Genazzani AA, Porta C. NAMPT: A pleiotropic modulator of monocytes and macrophages. *Pharmacol Res.* 2018;135:25-36.
200. Kern P.A., Dicker-Brown A., Said S.T., Kennedy R., Fonseca V.A., 2002. The stimulation of tumor necrosis factor and inhibition of glucose transport and lipoprotein lipase in adipose cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-pdioxin. *Metabolism* 51: 65-68.

201. Sopoulos VR, Sandqvist M, Gustafson B, Hammarstedt A, Schmelz M, Yang X, Jansson PA, Smith U. High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator. *Obes Res.* 2004 Mar;12(3):454-60.
202. Taylor EB. The complex role of adipokines in obesity, inflammation, and autoimmunity. *Clin Sci (Lond).* 2021 Mar 26;135(6):731-75.
203. Mohamed-Ali V., Goodrick S., Rawesh A., Katz D.R., Miles J.M., Yudkin J.S., Klein S., Coppack S.W., 1997. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*; 82: 4196-4200.57.
204. Xu H, Uysal KT, Becherer JD, Arner P, Hotamisligil GS. Altered tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) processing in adipocytes and increased expression of transmembrane TNF-alpha in obesity. *Diabetes*, 51(6):1876-83, 2002.
205. Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumié A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*, 53(5):1285-92, 2004.
206. Isakson P, Hammarstedt A, Gustafson B, Smith U. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor-alpha, and inflammation. *Diabetes*, 58(7):1550-7, 2009.
207. Xu H., Barnes G.T., Yang Q., Tan G., Yang D., Chou C.J., Sole J., Nichols A., Ross J.S., Tartaglia L.A., Chen H., 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*; 112: 1821-30.
208. Artemniak-Wojtowicz D, Kucharska AM, Pyrzak B. Obesity and chronic inflammation crosslinking. *Cent Eur J Immunol.* 2020;45(4):461-468.
209. Tchoukalova YD, Sarr MG, Jensen MD. Measuring committed preadipocytes in human adipose tissue from severely obese patients by using adipocyte fatty acid binding protein. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 287(5):R1132-40, 2004.
210. Canello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumié A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clément K. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*, 54(8):2277-86, 2005.
211. Bai Y, Sun Q. Macrophage recruitment in obese adipose tissue. *Obes Rev.* 2015;16(2):127-36.
212. Rossi S, Cordella M, Tabolacci C, et al. TNF-alpha and metalloproteases as key players in melanoma cells aggressiveness. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1):326.
213. Richmond A, Yang J, Su Y. The good and the bad of chemokines/ chemokine receptors in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22(2): 175-86.

214. Han YP, Tuan TL, Hughes M, Wu H, Garner WL. Transforming growth factor- β -and tumor necrosis factor- α -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J Biol Chem.* 2001;276(25):22341–50.
215. Sarvaiya PJ, Guo D, Ulasov I, Gabikian P, Lesniak MS. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget.* 2013;4(12):2171–85.
216. Tarallo R, Giurato G, Bruno G, Ravo M, Rizzo F, Salvati A, Ricciardi L, Marchese G, Cordella A, Rocco T, et al. The nuclear receptor ER β engages AGO2 in regulation of gene transcription, RNA splicing and RISC loading. *Genome Biol.* 2017;18:189.
217. Troeberg L, Nagase H. Measurement of matrix metalloproteinase activities in the medium of cultured synoviocytes using zymography. *Methods Mol Biol.* 2003;225:77–87.
218. Villar-Fincheira P, Sanhueza-Olivares F, Norambuena-Soto I, Cancino-Arenas N, Hernandez-Vargas F, Troncoso R, Gabrielli L, Chiong M. Role of Interleukin-6 in Vascular Health and Disease. *Front Mol Biosci.* 2021 Mar 16;8:641734.
219. Han YP, Tuan TL, Hughes M, Wu H, Garner WL. Transforming growth factor- β -and tumor necrosis factor- α -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J Biol Chem.* 2001;276(25):22341–22350.
220. Salemi R, Falzone L, Madonna G, Polesel J, Cinà D, Mallardo D, Ascierto PA, Libra M, S Candido S. MMP-9 as a candidate marker of response to BRAF inhibitors in melanoma patients with BRAFV600E mutation detected in circulating-free DNA. *Front Pharmacol.* 2018;9:856.
221. Zhang Z, Zhu S, Yang Y, Ma X, Guo S. Matrix metalloproteinase-12 expression is increased in cutaneous melanoma and associated with tumor aggressiveness. *Tumour Biol.* 2015;36(11):8593–8600.
222. Gong C, Shen J, Fang Z, Qiao L, Feng R, Lin X, Li S. Abnormally expressed JunB transactivated by IL-6/STAT3 signaling promotes uveal melanoma aggressiveness via epithelial-mesenchymal transition. *Biosci Rep.* 2018;38(4).
223. Rømer J, Lund LR, Eriksen J, Ralfkiaer E, Zeheb R, Gelehrter TD, Danø K, Kristensen P. Differential expression of urokinase-type plasminogen activator and its type-1 inhibitor during healing of mouse skin wounds. *J Invest Dermatol.* 1991;97(5):803-11.
224. Lund LR, Eriksen J, Ralfkiaer E, Rømer J. Differential expression of urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and inhibitors in mouse skin after exposure to a tumor-promoting phorbol ester. *J Invest Dermatol.* 1996;106(4):622-30.
225. Santibanez JF. Transforming growth factor-Beta and urokinase-type plasminogen activator: dangerous partners in tumorigenesis-implications in skin cancer. *ISRN Dermatol.* 2013;2013:597927.
226. Flevaris P, Vaughan D. The Role of Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 in Fibrosis. *Semin Thromb Hemost.* 2017;43(2):169-177.

227. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246(4935):1306-9.
228. Bagchi M, Kim LA, Boucher J, Walshe TE, Kahn CR, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor is important for brown adipose tissue development and maintenance. *FASEB J*. 2013;27(8):3257-71.
229. Elias I, Franckhauser S, Ferré T, Vilà L, Tafuro S, Muñoz S, Roca C, Ramos D, Pujol A, Riu E, Ruberte J, Bosch F. Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2012 Jul;61(7):1801-13.
230. Sun K, Kusminski CM, Luby-Phelps K, Spurgin SB, An YA, Wang QA, Holland WL, Scherer PE. Brown adipose tissue derived VEGF-A modulates cold tolerance and energy expenditure. *Mol Metab*. 2014;3(4):474-83.
231. Wang X, Montoyo-Pujol YG, Bermudez S, Corpas G, Martin A, Almazan F, Cabrera T, López-Nevot MA. Serum Cytokine Profiles of Melanoma Patients and Their Association with Tumor Progression and Metastasis. *J Oncol*. 2021 Jan 28;2021:6610769.
232. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* (1996) 86(3):353–64.
233. Cho WC, Jour G, Aung PP. Role of angiogenesis in melanoma progression: update on key angiogenic mechanisms and other associated components. *Semin Cancer Biol* (2019) 59:175–86.
234. Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2008;8: 915–28.
235. Travis RC, Appleby PN, Martin RM, et al. A meta-analysis of individual participant data reveals an association between circulating levels of IGF-I and prostate cancer risk. *Cancer Res* 2016; 76:2288–300.
236. Anisimov VN, Bartke A. The key role of growth hormone-insulin-IGF-1 signaling in aging and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013 Sep;87(3):201-23.
237. Schmidt JA, Allen NE, Almquist M, et al. Insulin-like growth factor-I and risk of differentiated thyroid carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23:976–85.
238. Kucera R, Treskova I, Vrzalova J, et al. Evaluation of IGF1 serum levels in malignant melanoma and healthy subjects. *Anticancer Res* 2014;34:5217–20.
239. Park SL, Setiawan VW, Kanetsky PA, et al. Serum insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 levels with risk of malignant melanoma. *Cancer Causes Control* 2011;22:1267–75.
240. Bradbury KE, Appleby PN, Tipper SJ, et al. Circulating insulin-like growth factor I in relation to melanoma risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Int J Cancer*. 2019; 144(5): 957–966.

241. Cheng HC, Chang TK, Su WC, Tsai HL, Wang JY. Narrative review of the influence of diabetes mellitus and hyperglycemia on colorectal cancer risk and oncological outcomes. *Transl Oncol.* 2021;14(7):101089.
242. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* 2004;25(2):75-84.
243. Fernandez EJ, Lolis E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42:469-99.
244. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett.* 2008 ;267(2):226-44.
245. Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity.* 2012;36(5):705-16.
246. Moepps B, Nuessler E, Braun M, Gierschik P. A homolog of the human chemokine receptor CXCR1 is expressed in the mouse. *Mol Immunol.* 2006;43(7):897-914.
247. Nomiyama H, Osada N, Yoshie O. The evolution of mammalian chemokine genes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(4):253-62.
248. Mukaida N, Sasaki S, Baba T. Chemokines in cancer development and progression and their potential as targeting molecules for cancer treatment. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:170381.
249. Huang B, Han W, Sheng ZF, Shen GL. Identification of immune-related biomarkers associated with tumorigenesis and prognosis in cutaneous melanoma patients. *Cancer Cell Int.* 2020; 20:195.
250. Oba J, Wei W, Gershenwald JE, Johnson MM, Wyatt CM, Ellerhorst JA, Grimm EA. Elevated Serum Leptin Levels are Associated With an Increased Risk of Sentinel Lymph Node Metastasis in Cutaneous Melanoma. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(11):3073.
251. Coelho P, Almeida J, Prudêncio C, Fernandes R, Soares R. Effect of Adipocyte Secretome in Melanoma Progression and Vasculogenic Mimicry. *J Cell Biochem.* 2016;117(7):1697-706.
252. Kushihiro K, Núñez NP. Ob/ob serum promotes a mesenchymal cell phenotype in B16BL6 melanoma cells. *Clin Exp Metastasis.* 2011;28(8):877-86.
253. Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1831(10):1533-41.
254. Zhang T, Tseng C, Zhang Y, Sirin O, Corn PG, Li-Ning-Tapia EM, Troncoso P, Davis J, Pettaway C, Ward J, Frazier ML, Logothetis C, Kolonin MG. CXCL1 mediates obesity-associated adipose stromal cell trafficking and function in the tumour microenvironment. *Nat Commun.* 2016;7:11674.
255. Allavena P, Germano G, Marchesi F, Mantovani A. Chemokines in cancer related inflammation. *Experimental Cell Research,* 2011;317(5): 664–673
256. Kitadai Y, Haruma K, Mukaida N et al. Regulation of disease-progression genes in human gastric carcinoma cells by interleukin 8. *Clinical Cancer Research* 2000;6: 2735-2740.

257. Wang B, Hendricks DT, Wamunyokoli F, Parker MI. A growth-related oncogene/CXC chemokine receptor 2 autocrine loop contributes to cellular proliferation in esophageal cancer. *Cancer Res.* 2006; 66(6):3071–3077.
258. Singh S, Nannuru KC, Sadanandam A, Varney ML, Singh RK. CXCR1 and CXCR2 enhances human melanoma tumourigenesis, growth and invasion. *Br J of Cancer.* 2009; 100(10):1638-1646
259. Muller A, Homey B, Soto H et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50–56.
260. Amersi FF, Terando AM, Goto Y et al. Activation of CCR9/CCL25 in cutaneous melanoma mediates preferential metastasis to the small intestine. *Clin Cancer Res* 2008; 14(3):638–645.
261. Strong AL, Burow ME, Gimble JM, Bunnell BA. Concise review: The obesity cancer paradigm: exploration of the interactions and crosstalk with adipose stem cells. *Stem Cells.* 2015;33(2):318-26.
262. Jung JI, Cho HJ, Jung YJ, Kwon SH, Her S, Choi SS, Shin SH, Lee KW, Park JH. High-fat diet-induced obesity increases lymphangiogenesis and lymph node metastasis in the B16F10 melanoma allograft model: roles of adipocytes and M2-macrophages. *Int J Cancer.* 2015;136(2):258-70.
263. Wagner M, Bjerkvig R, Wiig H, Melero-Martin JM, Lin RZ, Klagsbrun M, Dudley AC. Inflamed tumor-associated adipose tissue is a depot for macrophages that stimulate tumor growth and angiogenesis. *Angiogenesis.* 2012;15(3):481-95.
264. Hossain F, Al-Khami AA, Wyczechowska D, Hernandez C, Zheng L, Reiss K, Valle LD, Trillo-Tinoco J, Maj T, Zou W, Rodriguez PC, Ochoa AC. Inhibition of Fatty Acid Oxidation Modulates Immunosuppressive Functions of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances Cancer Therapies. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(11):1236-47.
265. Zoico E, Darra E, Rizzatti V, Tebon M, Franceschetti G, Mazzali G, Rossi AP, Fantin F, Zamboni M. Role of adipose tissue in melanoma cancer microenvironment and progression. *Int J Obes (Lond).* 2018;42(3):344-352.
266. Ko JH, Um JY, Lee SG, Yang WM, Sethi G, Ahn KS. Conditioned media from adipocytes promote proliferation, migration, and invasion in melanoma and colorectal cancer cells. *J Cell Physiol.* 2019;234(10):18249-18261.
267. Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1831(10):1533-41.
268. Heissig B, Salama Y, Osada T, Okumura K, Hattori K. The Multifaceted Role of Plasminogen in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5):2304.
269. Kubala M.H., Punj V., Placencio-Hickok V.R., Fang H., Fernandez G.E., Sposto R., DeClerck Y.A. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promotes the Recruitment and Polarization of Macrophages in Cancer. *Cell Rep.* 2018;25:2177–2191

270. de Vries TJ, Quax PH, Denijn M, Verrijp KN, Verheijen JH, Verspaget HW, Weidle UH, Ruiter DJ, van Muijen GN. Plasminogen activators, their inhibitors, and urokinase receptor emerge in late stages of melanocytic tumor progression. *Am J Pathol.* 1994 Jan;144(1):70-81.
271. Biagioni A, Laurenzana A, Menicacci B, Peppicelli S, Andreucci E, Bianchini F, Guasti D, Paoli P, Serrati S, Mocali A, Calorini L, Del Rosso M, Fibbi G, Chillà A, Margheri F. uPAR-expressing melanoma exosomes promote angiogenesis by VE-Cadherin, EGFR and uPAR overexpression and rise of ERK1,2 signaling in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(6):3057-3072.
272. Brungs D, Chen J, Aghmesheh M, Vine KL, Becker TM, Carolan MG, Ranson M. The urokinase plasminogen activation system in gastroesophageal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(14):23099-23109.
273. Klein, R.M.; Bernstein, D.; Higgins, S.P.; Higgins, C.E.; Higgins, P.J. SERPINE1 expression discriminates site-specific metastasis in human melanoma. *Exp. Dermatol.* 2012, 21, 551–554.
274. Garofalo C, Surmacz E. Leptin and cancer. *J Cell Physiol.* 2006;207(1):12-22.
275. Münzberg H, Björnholm M, Bates SH, Myers MG., Jr Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62:642–52.
276. Anagnostoulis S, Karayiannakis AJ, Lambropoulou M, Efthimiadou A, Polychronidis A, Simopoulos C. Human leptin induces angiogenesis in vivo. *Cytokine.* 2008;42:353–7.
277. Cao R, Brakenhielm E, Wahlestedt C, Thyberg J, Cao Y. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:6390–5.
278. Gonzalez RR, Cherfils S, Escobar M, Yoo JH, Carino C, Styer AK, et al. Leptin signaling promotes the growth of mammary tumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R2) *J Biol Chem.* 2006;281:26320–8.
279. Gonzalez-Perez RR, Xu Y, Guo S, Watters A, Zhou W, Leibovich SJ. Leptin upregulates VEGF in breast cancer via canonic and non-canonical signalling pathways and NFkappaB/HIF-1alpha activation. *Cell Signal.* 2010;22:1350–62.
280. Rene Gonzalez R, Watters A, Xu Y, Singh UP, Mann DR, Rueda BR, et al. Leptin-signaling inhibition results in efficient anti-tumor activity in estrogen receptor positive or negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2009;11:R36.
281. Zhou W, Guo S, Gonzalez-Perez RR. Leptin pro-angiogenic signature in breast cancer is linked to IL-1 signalling. *Br J Cancer.* 2011;104:128–37.
282. Sun B, Zhang S, Ni C, Zhang D, Liu Y, Zhang W, et al. Correlation between melanoma angiogenesis and the mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells derived from bone marrow. *Stem Cells Dev.* 2005;14:292–8.
283. Amjadi F, Mehdipoor R, Zarkesh-Esfahani H, Javanmard SH. Leptin serves as angiogenic/mitogenic factor in melanoma tumor growth. *Adv Biomed Res.* 2016;5:127.

284. Vona-Davis L, Rose DP. Angiogenesis, adipokines and breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20:193–201.
285. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Roccaro AM, Vacca A. The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia.* 2007;21:44–52.
286. Patel D, Bassi R, Hooper AT, Sun H, Huber J, Hicklin DJ, et al. Enhanced suppression of melanoma tumor growth and metastasis by combined therapy with anti-VEGF receptor and anti-TYRP-1/gp75 monoclonal antibodies. *Anticancer Res.* 2008;28:2679–86.
287. Ribatti D, Nico B, Belloni AS, Vacca A, Roncali L, Nussdorfer GG. Angiogenic activity of leptin in the chick embryo chorioallantoic membrane is in part mediated by endogenous fibroblast growth factor-2. *Int J Mol Med.* 2001;8:265–8.
288. Amjadi F, Javanmard SH, Zarkesh-Esfahani H, Khazaei M, Narimani M. Leptin promotes melanoma tumor growth in mice related to increasing circulating endothelial progenitor cells numbers and plasma NO production. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30:21.
289. Somasundar P, McFadden DW, Hileman SM, Vona-Davis L. Leptin is a growth factor in cancer. *J Surg Res.* 2004;116:337–49.
290. Malvi P, Chaube B, Singh SV, Mohammad N, Vijayakumar MV, Singh S, Chouhan S, Bhat MK. Elevated circulatory levels of leptin and resistin impair therapeutic efficacy of dacarbazine in melanoma under obese state. *Cancer Metab.* 2018; 6:2.
291. Malvi P, Chaube B, Pandey V, Vijayakumar MV, Boreddy PR, Mohammad N, Singh SV, Bhat MK. Obesity induced rapid melanoma progression is reversed by orlistat treatment and dietary intervention: role of adipokines. *Mol Oncol.* 2015;9(3):689-703.
292. Ellerhorst JA, Diwan AH, Dang SM, Uffort DG, Johnson MK, Cooke CP, Grimm EA. Promotion of melanoma growth by the metabolic hormone leptin. *Oncol Rep.* 2010;23(4):901-7.
293. Gogas H, Trakatelli M, Dessypris N, Terzidis A, Katsambas A, Chrousos GP, Petridou ET. Melanoma risk in association with serum leptin levels and lifestyle parameters: a case-control study. *Ann Oncol.* 2008;19(2):384-9.
294. Tessitore L, Vizio B, Jenkins O, De Stefano I, Ritossa C, Argiles JM, et al. Leptin expression in colorectal and breast cancer patients. *Int J Mol Med.* 2000;5:421–6.
295. Hu X, Juneja SC, Maihle NJ, Cleary MP. Leptin – A growth factor in normal and malignant breast cells and for normal mammary gland development. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:1704–11.
296. Brandon EL, Gu JW, Cantwell L, He Z, Wallace G, Hall JE. Obesity promotes melanoma tumor growth: role of leptin. *Cancer Biol Ther.* 2009;8(19):1871-9.
297. Somasundar P, Frankenberry KA, Skinner H, Vedula G, McFadden DW, Riggs D, et al. Prostate cancer cell proliferation is influenced by leptin. *J Surg Res.* 2004;118:71–82.
298. Okumura M, Yamamoto M, Sakuma H, Kojima T, Maruyama T, Jamali M, et al. Leptin and high glucose stimulate cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells: Reciprocal involvement of PKC-alpha and PPAR expression. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1592:107–16.

299. Mizutani H, Fukushima S, Masuguchi S, Yamashita J, Miyashita A, Nakahara S, Aoi J, Inoue Y, Jinnin M, Ihn H. Serum levels of leptin receptor in patients with malignant melanoma as a new tumor marker. *Exp Dermatol*. 2013;22(11):748-9.
300. Magni G, Amici A, Emanuelli M, Raffaelli N, Ruggieri S. Enzymology of NAD⁺ synthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1999;73:135-82.
301. Ziegler M. New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur J Biochem*. 2000 Mar;267(6):1550-64.
302. Galli U, Travelli C, Massarotti A, Fakhfoury G, Rahimian R, Tron GC, Genazzani AA. Medicinal chemistry of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors. *J Med Chem*. 2013;56(16):6279-96.
303. Garten A, Petzold S, Körner A, Imai S, Kiess W. Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(3):130-8
304. Sampath D, Zabka TS, Misner DL, O'Brien T, Dragovich PS. Inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) as a therapeutic strategy in cancer. *Pharmacol Ther*. 2015;151:16-31.
305. Holen K, Saltz LB, Hollywood E, Burk K, Hanauske AR. The pharmacokinetics, toxicities, and biologic effects of FK866, a nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis inhibitor. *Invest New Drugs*. 2008;26(1):45-51.
306. von Heideman A, Berglund A, Larsson R, Nygren P. Safety and efficacy of NAD depleting cancer drugs: results of a phase I clinical trial of CHS 828 and overview of published data. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;65(6):1165-72.
307. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, Tilg H. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol*. 2007 1;178(3):1748-58.
308. Kukla M, Mazur W, Bułdak RJ, Zwirska-Korczala K. Potential role of leptin, adiponectin and three novel adipokines--visfatin, chemerin and vaspin--in chronic hepatitis. *Mol Med*. 2011;17(11-12):1397-410.
309. Audrito V, Serra S, Brusa D, Mazzola F, Arruga F, Vaisitti T, Coscia M, Maffei R, Rossi D, Wang T, Inghirami G, Rizzi M, Gaidano G, Garcia JG, Wolberger C, Raffaelli N, Deaglio S. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) promotes M2 macrophage polarization in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015;125(1):111-23.
310. Bi TQ, Che XM, Liao XH, Zhang DJ, Long HL, Li HJ, Zhao W. Overexpression of Nampt in gastric cancer and chemopotentiating effects of the Nampt inhibitor FK866 in combination with fluorouracil. *Oncol Rep*. 2011 Nov;26(5):1251-7.
311. Shackelford RE, Mayhall K, Maxwell NM, Kandil E, Coppola D. Nicotinamide phosphoribosyltransferase in malignancy: a review. *Genes Cancer*. 2013 Nov;4(11-12):447-56.

312. Grolla AA, Torretta S, Gnemmi I, Amoruso A, Orsomando G, Gatti M, Caldarelli A, Lim D, Penengo L, Brunelleschi S, Genazzani AA, Travelli C. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/visfatin) is a tumoural cytokine released from melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015 Nov;28(6):718-29.
313. Maldi E, Travelli C, Caldarelli A, Agazzone N, Cintura S, Galli U, Scatolini M, Ostano P, Miglino B, Chiorino G, Boldorini R, Genazzani AA. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) is over-expressed in melanoma lesions. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013;26(1):144-6.
314. Chiarugi A, Dölle C, Felici R, Ziegler M. The NAD metabolome—A key determinant of cancer cell biology. *Nat. Rev. Cancer.* 2012;12:741–752.
315. Audrito V, Managò A, La Vecchia S, Zamporlini F, Vitale N, Baroni G, Cignetto S, Serra S, Bologna C, Stingi A, et al. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase (NAMPT) as a Therapeutic Target in BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 2018;110:290–303.
316. Ohanna M., Cerezo M., Nottet N., Bille K., Didier R., Beranger G., Mograbi B., Rocchi S., Yvan-Charvet L., Ballotti R., et al. Pivotal role of NAMPT in the switch of melanoma cells toward an invasive and drug-resistant phenotype. *Genes Dev.* 2018;32:448–461.
317. Park HJ, Kim SR, Kim SS, Wee HJ, Bae MK, Ryu MH, Bae SK. Visfatin promotes cell and tumor growth by upregulating Notch1 in breast cancer. *Oncotarget.* 2014;5(13):5087-99.
318. Audrito V, Messana VG, Moiso E, Vitale N, Arruga F, Brandimarte L, Gaudino F, Pellegrino E, Vaisitti T, Riganti C, Piva R, Deaglio S. NAMPT Over-Expression Recapitulates the BRAF Inhibitor Resistant Phenotype Plasticity in Melanoma. *Cancers (Basel).* 2020;12(12):3855.
319. Travelli C, Aprile S, Mattoteia D, Colombo G, Clemente N, Scanziani E, Terrazzino S, Alisi MA, Polenzani L, Grosa G, Genazzani AA, Tron GC, Galli U. Identification of potent triazolylpyridine nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors bearing a 1,2,3-triazole tail group. *Eur J Med Chem.* 2019 Nov 1;181:111576.
320. Galli U, Colombo G, Travelli C, Tron GC, Genazzani AA, Grolla AA. Recent Advances in NAMPT Inhibitors: A Novel Immunotherapeutic Strategy. *Front Pharmacol.* 2020;11:656.
321. Travelli C, Consonni FM, Sangaletti S, Storto M, Morlacchi S, Grolla AA, Galli U, Tron GC, Portararo P, Rimassa L, Pressiani T, Mazzone M, Trovato R, Ugel S, Bronte V, Tripodo C, Colombo MP, Genazzani AA, Sica A. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Acts as a Metabolic Gate for Mobilization of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.* 2019;79(8):1938-1951.
322. Soncini D, Caffa I, Zoppoli G, Cea M, Cagnetta A, Passalacqua M, Mastracci L, Boero S, Montecucco F, Sociali G, Lasigliè D, Damonte P, Grozio A, Mannino E, Poggi A, D'Agostino VG, Monacelli F, Provenzani A, Odetti P, Ballestrero A, Bruzzone S, Nencioni A. Nicotinamide phosphoribosyltransferase promotes epithelial-to-mesenchymal transition as a soluble factor independent of its enzymatic activity. *J Biol Chem.* 2014;289(49):34189-204.

323. Zhang B, Shi D, Zhang X, Liang G, Liu W, Qiao S. FK866 inhibits the epithelial-mesenchymal transition of hepatocarcinoma MHCC97-H cells. *Oncol Lett.* 2018;16(6):7231-7238.
324. Pylaeva E, Spyra I, Bordbari S, Lang S, Jablonska J. Transfer of Manipulated Tumor-associated Neutrophils into Tumor-Bearing Mice to Study their Angiogenic Potential In Vivo. *J Vis Exp.* 2019;(149).
325. Richmond A, Thomas HG. Melanoma growth stimulatory activity: Isolation from human melanoma tumors and characterization of tissue distribution. *J. Cell. Biochem.* 1988; 36(2):185–198.
326. Owen JD, Strieter R, Burdick M, Haghnegahdar H, Nanney L, Shattuck-Brandt R, Richmond A. Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated cytokine beta and gamma proteins. *Int. J. Cancer.* 1997;73(1):94–103.
327. Luan J, Shattuck-Brandt R, Haghnegahdar H, Owen JD, Strieter R, Burdick M, Nirodi C, Beauchamp D, Johnson KN, Richmond A. Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J. Leukoc. Biol.* 1997; 62(5): 588–597.
328. Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY, Buechi L, Walz A, Richmond A, Strieter RM. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J. Immunol.* 2000; 165(9):5269–5277.
329. Burger M, Burger JA, Hoch RC, Oades Z, Takamori H, Schraufstatter IU. Point mutation causing constitutive signaling of CXCR2 leads to transforming activity similar to Kaposi's sarcoma herpesvirus-G protein-coupled receptor. *J. Immunol.* 1999; 163(4):2017–2022.
330. Miyake M, Goodison S, Urquidi V, Gomes Giacoia E, Rosser CJ. Expression of CXCL1 in human endothelial cells induces angiogenesis through the CXCR2 receptor and the ERK1/2 and EGF pathways. *Lab Invest.* 2013;93(7):768-78.
331. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases. *Adv Cancer Res.* 2010;106:91-111.
332. Dhawan P, Richmond A. Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma. *J Leukoc Biol.* 2002;72(1):9-18.
333. Singh S, Sadanandam A, Varney ML, Nannuru KC, Singh RK. Small interfering RNA-mediated CXCR1 or CXCR2 knock-down inhibits melanoma tumor growth and invasion. *Int J Cancer.* 2010;126(2):328-36.
334. Dong YL, Kabir SM, Lee ES, Son DS. CXCR2-driven ovarian cancer progression involves upregulation of proinflammatory chemokines by potentiating NF- κ B activation via EGFR-transactivated Akt signaling. *PLoS One.* 2013;8(12):e83789.
335. Saintigny P, Massarelli E, Lin S, Ahn YH, Chen Y, Goswami S, Erez B, O'Reilly MS, Liu D, Lee JJ, Zhang L, Ping Y, Behrens C, Solis Soto LM, Heymach JV, Kim ES, Herbst RS, Lippman SM,

- Wistuba II, Hong WK, Kurie JM, Koo JS. CXCR2 expression in tumor cells is a poor prognostic factor and promotes invasion and metastasis in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2013;73(2):571-82.
- 336.Liu Q, Li A, Tian Y, Wu JD, Liu Y, Li T, Chen Y, Han X, Wu K. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;31:61-71.
- 337.Zhou X, Peng M, He Y, Peng J, Zhang X, Wang C, Xia X, Song W. CXC Chemokines as Therapeutic Targets and Prognostic Biomarkers in Skin Cutaneous Melanoma Microenvironment. *Front Oncol.* 2021;11:619003.
- 338.Rossi S, Cordella M, Tabolacci C, Nassa G, D'Arcangelo D, Senatore C, Pagnotto P, Magliozzi R, Salvati A, Weisz A, Facchiano A, Facchiano F. TNF-alpha and metalloproteases as key players in melanoma cells aggressiveness. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1):326.
- 339.Richmond A, Yang J, Su Y. The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22(2):175–186.
- 340.Jenkins MH, Brinckerhoff CE, Mullins DW. CXCR3 signaling in BRAFWT melanoma increases IL-8 expression and tumorigenicity. *PLoS One.* 2015;10:e0121140.
- 341.Moretti S, Pinzi C, Spallanzani A, Berti E, Chiarugi A, Mazzoli S Fabiani M, Vallecchi C, Herlyn M. Immunohistochemical evidence of cytokine networks during progression of human melanocytic lesions. *Int J Cancer.* 1999;84(2):160–168.
- 342.Lebrec H, Ponce R, Preston BD, Iles J, Born TL, Hooper M. Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor inhibition, and cancer risk. *Curr Med Res Opin.* 2015;31(3):557–574.
- 343.Fortis SP, Mahaira LG, Anastasopoulou EA, Voutsas IF, Perez SA, Baxevanis CN. Immune profiling of melanoma tumors reflecting aggressiveness in a preclinical model. *Cancer Immunol Immunother.* 2017;66(12):1631–1642.
- 344.Donia M, Kjeldsen JW, Svane IM. The controversial role of TNF in melanoma. *Oncoimmunology.* 2015;5(4):e1107699.
- 345.Melnikova VO, Bar-Eli M. Inflammation and melanoma metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22(3):257–267.
- 346.Delaunay T, Deschamps L, Haddada M, Walker F, Soosaipillai A, Soualmia F, El Amri C, Diamandis EP, Brattsand M. Magdolen et al. aberrant expression of kallikrein-related peptidase 7 is correlated with human melanoma aggressiveness by stimulating cell migration and invasion. *Mol Oncol.* 2017;11:1330–1347.