



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Pediatria Salus Pueri

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : Medicina dello Sviluppo e Scienze della Programmazione

INDIRIZZO: Genetica Biochimica e Molecolare

CICLO: 23°

Tesi di Dottorato

ANALISI DI POLIMORFISMI GENETICI DEL GENE TP53 E DEL GENE EGF IN

PAZIENTI CON NEVI MELANOCITICI MULTIPLI

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Maurizio Scarpa

Supervisore : Ch.mo Prof. Mauro Alaibac

Dottorando: Edoardo Zattra

INDICE

INTRODUZIONE.....	1
I polimorfismi genetici.....	1
P53: struttura e funzione.....	4
Struttura di TP53.....	5
Regolazione di p53.....	8
Funzioni di p53.....	11
Mutazioni di TP53 e neoplasie.....	14
Polimorfismi di TP53 e neoplasie.....	16
EGF: struttura e funzione.....	18
Il recettore EGFR.....	19
Superfamiglia EGF ed EGFR e cancro.....	21
Polimorfismi dell'EGF.....	22
Nevi melanocitici e dermatoscopia.....	27
Patterns dermatoscopici tipici dei nevi melanocitari benigni.....	39
Patterns dermatoscopici tipici di lesioni non melanocitarie.....	54
Melanoma Maligno.....	57
Caratteristiche cliniche del melanoma maligno.....	63
Caratteristiche dermatoscopiche del melanoma maligno.....	64
Difficoltà diagnostica del melanoma in fase precoce.....	65
SCOPO DELLO STUDIO.....	67
MATERIALI E METODI.....	68
Analisi statistica.....	73

RISULTATI.....	74
DISCUSSIONE.....	78
CONCLUSIONI.....	86
BIBLIOGRAFIA.....	87

RIASSUNTO

Background: p53 è in grado di modificare l'attività dei melanociti, in particolare la proliferazione di queste cellule. P53 è un attivatore della trascrizione di geni che codificano per proteine con azione stimolatoria sulla proliferazione dei melanociti, pertanto in questo modo p53 può favorire l'insorgenza e la progressione del melanoma maligno. L'Epidermal Growth Factor (EGF) è un fattore di crescita membro della superfamiglia EGF. E' stato dimostrato che l'EGF attiva la proliferazione cellulare e stimola la mitogenesi nel tessuto cutaneo, stimolando la crescita tumorale. E' stato dimostrato che la presenza di più di 100 nevi melanocitici è un fattore di rischio importante per la comparsa del melanoma maligno.

Scopo dello studio: I polimorfismi genetici presi in esame in questo studio (IVS6 +62 G> A all'introne 6 di TP53 ed EGF +61A>G e) secondo numerosi studi potrebbero giocare un ruolo nell'insorgenza e nella progressione di diverse neoplasie. Abbiamo analizzato i suddetti polimorfismi in una popolazione di pazienti con più di 100 nevi melanocitici mettendo tali dati a confronto con una popolazione di controllo con meno di 10 nevi melanocitici. Tali pazienti sono stati accuratamente selezionati attraverso esami clinici e dermatoscopici.

Materiali e Metodi: Per lo studio di p53 abbiamo incluso 98 pazienti e 117 controlli, mentre per lo studio dell' EGF abbiamo incluso 128 pazienti e 127 controlli tutti di età compresa tra i 21 e i 60 anni. I pazienti presentavano più di 100 nevi melanocitici di dimensioni superiori a 3 millimetri di diametro. I controlli erano soggetti con meno di 10 nevi melanocitici. Per l'analisi del polimorfismo il DNA è stato estratto da sangue periferico e il genotipo è stato studiato mediante High Resolution Melt Analysis (HRM).

Risultati: Il genotipo A/A di p53, era presente nel 4.2% dei pazienti contro il 1.9% dei controlli. Il genotipo G/A era significativamente maggiore nei pazienti (32.5%) che nei controlli (23.6%). Per quanto riguarda le frequenze alleliche, l'allele G era presente nel 79.6% dei pazienti e nel 86.3% dei controlli mentre l'allele A era presente nel 20,4% dei pazienti e nel 13,7% dei controlli. Per quanto riguarda EGF, il genotipo A/A era presente nel 35% dei pazienti e nel 38% dei controlli. Il genotipo A/G era presente nel 48% dei pazienti e nel 44% dei controlli mentre il genotipo G/G era presente nel 18% dei pazienti e nel 17% dei controlli. Per quanto riguarda la frequenza allelica, A era presente nel 59% dei pazienti e nel 60% dei controlli, mentre G era presente nel 41% dei pazienti e nel 40% dei controlli.

Conclusioni: non è stata rilevata una correlazione significativa tra il polimorfismo EGF +61A>G e la presenza di un alto numero di nevi melanocitici. Il polimorfismo IVS6 +62 G> A del gene TP53 sembra invece essere associato con la presenza di un elevato numero di nevi melanociti essendo la frequenza di questo polimorfismo significativamente maggiore nei casi rispetto ai controlli. E'

plausibile che alterazioni dell'espressione della p53, sia pur minime come quelle osservabili nei polimorfismi genetici che coinvolgono regioni regolatorie del DNA, possano essere responsabili di un alterato controllo della proliferazione melanocitaria che si traduce clinicamente in un alto numero di nevi melanocitici.

ABSTRACT

Background: p53 have been extensively reported in the literature to be able to modify the activity of melanocytes, particularly in controlling the proliferation of these cells. P53 is a transcriptional activator of genes encoding for proteins that influence the proliferation of melanocytes and in this way the onset and progression of malignant melanoma. Epidermal Growth Factor (EGF) is a growth factor member of the EGF superfamily. It has been shown that it activates cell proliferation and stimulates mitogenesis in epidermal tissue, enhancing tumor growth. The presence of more than 100 nevi has been demonstrated to be a major risk factor for developing malignant melanoma.

Aim of the study: Several experimental data indicate that the two genetic polymorphism of EGF and P53 (IVS6 +62 G> A in intron 6 of TP53 and EGF +61A>G) could play a role in the onset and progression of several neoplasms. We studied the above-mentioned gene polymorphisms in a population of patients with more than 100 melanocytic nevi. Patients were carefully selected on the basis of an accurate clinical and dermatoscopic examination.

Materials and methods: As regards the IVS6 +62 G> A in intron 6 of TP53 polymorphism 98 patients and 117 controls were investigated while for the EGF +61A>G polymorphism we included in the study 128 patients and 127 controls. Patients were all aged between 21 and 60 years and had an high number of melanocytic nevi (>100). Controls were patients with a low number of nevi (< 10) of the same sex and age. For the analysis of the polymorphisms DNA was

extracted from peripheral blood and genotyped by High Resolution Melt Analysis (HRM).

Results:

For p53, the genotype (A/A) was present in 4.2% of the patients against a rate of 1.9% in controls. Genotype G/A was significantly increased in patients (32.5%) compared to controls (23.6%). With regard to allele frequencies, G allele was present in 79.6% of patients and 86.3% of controls whereas A allele was present in 20.4% of patients and 13.7% of controls. For EGF, genotype AA was present in 35% of patients and 38% of controls. Genotype A/G was present in 48% of patients and 44% of controls while genotype G/G was present in 17% of patients and 18% of controls. With regard to allele frequency, A was present in 59% of patients and in 60% of controls, whereas G was observed in 41% of patients and 40% of controls.

Conclusions: The polymorphism IVS6 +62 G> A of the TP53 gene was associated with the presence of more than 100 melanocytic nevi indicating that alterations in p53 expression, even if minimal as in this polymorphism, could cause an altered control of melanocytic proliferation that clinically reflects in a high number of melanocytic nevi. There was no significant correlation between the EGF +61A>G polymorphism and the presence of a high number of melanocytic nevi.

INTRODUZIONE

I polimorfismi genetici

Ogni gene può esistere in più forme che differiscono l'una dall'altra, definite "alleli". La variabilità allelica è all'origine della variabilità ereditaria all'interno di una specie ¹. Il genoma umano, al pari di quello degli altri esseri viventi, è un'entità dinamica che nel corso dell'evoluzione è andata e va tutt'ora incontro a variazioni della sequenza nucleotidica. Queste variazioni della sequenza del DNA vengono talora descritte come mutazioni, talora come polimorfismi. Si definisce "mutazione" una variazione rara ($\leq 1\%$ della popolazione generale) della sequenza nucleotidica originale (detta "wild type"). Si definisce invece "polimorfismo" una variazione comune ($\geq 1\%$) nella popolazione generale della sequenza di DNA wild type ². Pertanto è possibile affermare che il polimorfismo si manifesta, inizialmente, come una mutazione ma se con il tempo diventa componente stabile nella popolazione e se acquisisce una frequenza sufficiente all'interno di essa, diventa un polimorfismo. Un polimorfismo può essere rivelato dalle frequenze fenotipiche, dalla presenza di diverse varianti proteiche, di solito rilevabili mediante elettroforesi, o da differenze nelle sequenze geniche, non rilevabili nelle sequenze polipeptidiche perché consistenti in triplette sinonime o presenti in sequenze non tradotte.

Il più comune tra tutti i polimorfismi consiste nella mutazione di un singolo nucleotide: si parla in tal caso di SNP ("single nucleotide polymorphism"). Si ritiene che la variabilità individuale che distingue ogni soggetto dall'altro sia rappresentata dallo 0,1% del nostro DNA e sia sostanzialmente attribuibile alla

presenza dei polimorfismi genetici (figura 1). Questi cambiamenti di un singolo nucleotide fra due alleli si riscontrano all'incirca ogni 1330 basi. Nell'uomo ne sono stati identificati 3 milioni ma si calcola che ve ne siano almeno 10 milioni ³.

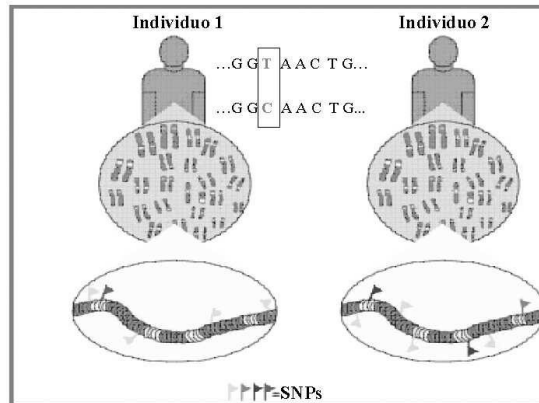


Figura 1: la variabilità individuale è sostanzialmente dovuta alla presenza degli SNP.

Gli SNPs sono i polimorfismi più comuni ma non sono gli unici. Tra gli altri possibili polimorfismi si ritrovano: delezioni/inserzioni di segmenti nucleotidici, ripetizioni di nucleotidi e variazioni del numero di copie di un gene.

Le mutazioni genetiche che sono causa di importanti malattie per la specie umana sono generalmente rare all'interno della popolazione perché esse riducono il successo riproduttivo della specie stessa. Le variazioni polimorfiche, in genere, non sono responsabili di importanti patologie. Questa distinzione tra mutazioni e polimorfismi, tuttavia, non può essere applicata rigorosamente: una variazione nucleotidica che in una popolazione è causa di una rara malattia, in un'altra popolazione può diventare un polimorfismo nel momento in cui questa conferisce un vantaggio selettivo; in tal caso si assisterà, infatti, ad un aumento della frequenza della variazione stessa all'interno della popolazione. Un noto esempio

in tal senso è rappresentato dalla variante allelica dell'anemia falciforme. Nella popolazione caucasica la variazione della sequenza nucleotidica del gene che codifica per la beta-globina (causa della grave patologia ematologica) è piuttosto rara e rappresenta, quindi, una mutazione. In certe aree dell'Africa, invece, lo stesso allele, che conferisce resistenza all'acquisizione della malaria, si manifesta con una frequenza più elevata ed è definito, pertanto, come polimorfico.

Recentemente le varianti polimorfiche sono divenute oggetto di grande attenzione per l'evidenza del loro ruolo nel determinare la suscettibilità o la resistenza individuale a molte delle malattie umane più comuni e ai farmaci ³. Nei profili genetici a rischio elevato gli SNPs conferiscono predisposizione allo sviluppo di una patologia; ulteriori variabili che contribuiscono a determinare la suscettibilità individuale alla patologia in questione sono definite da fattori ambientali. Potenzialmente, l'analisi degli SNPs potrebbe essere in grado di prevedere la suscettibilità ad un gran numero di patologie cliniche tra cui tumori, patologie cardiovascolari e malattie mentali.

P53: struttura e funzione

p53 fu identificata per la prima volta alla fine degli anni '70 in cellule infettate dal virus SV40 (simian virus 40) come una fosfoproteina che co-immunoprecipitava con l'antigene "large T". Si classificò, così, la p53 come antigene tumorale ^{4, 5, 4,5}. Successivamente, dal momento che questa proteina sembrava non condividere determinanti antigenici con l'antigene "large T" di SV40 e dal momento che la proteina fu in seguito isolata anche da cellule di carcinoma embrionale murino non infettate da SV40, si concluse che p53 fosse codificata da un gene cellulare, e non da un gene virale ⁶. La sequenza aminoacidica di p53 è altamente conservata nelle diverse specie di vertebrati: tale evidenza indica che la proteina svolge un importante ruolo nella fisiologia cellulare. p53 è presente in piccole concentrazioni nelle cellule normali, mentre nelle linee cellulari tumorali coltivate in vitro e nei tessuti tumorali in vivo questa concentrazione è significativamente molto più alta e la proteina presenta un aumento del tempo di emivita ^{7, 8, 9}. L'osservazione che molte cellule trasformate contengono più p53 rispetto alle corrispondenti cellule normali fece ritenere in un primo momento che p53 fosse il prodotto proteico di un oncogene e che l'aumento della proliferazione cellulare fosse il risultato dell'azione della proteina stessa; tale evidenza trovava fondamento anche nell'osservazione che il gene TP53 è in grado di cooperare con l'oncogene ras nella trasformazione dei fibroblasti di embrione di ratto¹⁰. Nel 1989 fu dimostrato che per ottenere tale risultato erano necessari cloni di p53 mutante ¹¹.

Alla luce di questi risultati è stato dimostrato che TP53 è un gene oncosoppressore: a tutt'oggi il prodotto della sua trascrizione, p53, viene considerato il soppressore tumorale più importante. p53 agisce attivando la

trascrizione di numerosi geni coinvolti in diverse attività compreso l'arresto del ciclo cellulare, la riparazione del DNA, la senescenza cellulare o l'apoptosi, in relazione all'entità del danno cellulare e ad altri fattori non ancora noti ¹². Il risultato complessivo delle funzioni di p53 è l'inibizione della crescita cellulare. Alcune mutazioni geniche possono dare origine a p53 mutanti che perdono la loro normale funzione inibitoria sulla duplicazione cellulare e acquisiscono una nuova attività stimolatoria nei confronti della crescita della cellula. Pertanto gli insulti genetici, se non opportunamente riparati, possono esitare in mutazioni del DNA trasmesse alle cellule figlie e, di conseguenza, nello sviluppo di neoplasie.

Struttura di TP53

La proteina p53 umana è una fosfoproteina di 393 aminoacidi che pesa 53kDa. Il gene TP53 è localizzato sul braccio corto del cromosoma umano 17 in posizione 17p13.1. La proteina presenta tre domini funzionali: il dominio N-terminale, il dominio centrale e il dominio C-terminale (figura 2). Il dominio N-terminale (1-100), denominato *dominio di trascrizione-attivazione (TAD)* contiene le sequenze necessarie per l'attivazione trascrizionale di p53 e il sito di legame della proteina regolatoria mdm2 che ha azione inibitoria sul processo di transattivazione di p53¹³. Il dominio centrale (101-306), denominato *dominio DNA-ligando (DNA binding-core domain o DBD)*, permette il legame della proteina con il DNA dei geni a valle ¹⁴. Il dominio centrale risulta la sede delle mutazioni a carico di p53 nel 90% dei casi di neoplasie umane ¹⁵. Il dominio C-terminale denominato *dominio di omo-oligomerizzazione (OD)* contiene le sequenze necessarie per la formazione di un tetramero di p53: la tetramerizzazione della proteina ne aumenta fortemente l'attività in vivo; il dominio OD contiene anche un sito di

localizzazione nucleare (NLS), una sequenza segnale per l'esportazione dal nucleo (NES- nuclear export signal) ed un dominio di legame non specifico con il DNA che lega il DNA danneggiato; inoltre quest'ultimo dominio è coinvolto anche nella down-regolazione del legame con il DNA mediato dal dominio centrale .

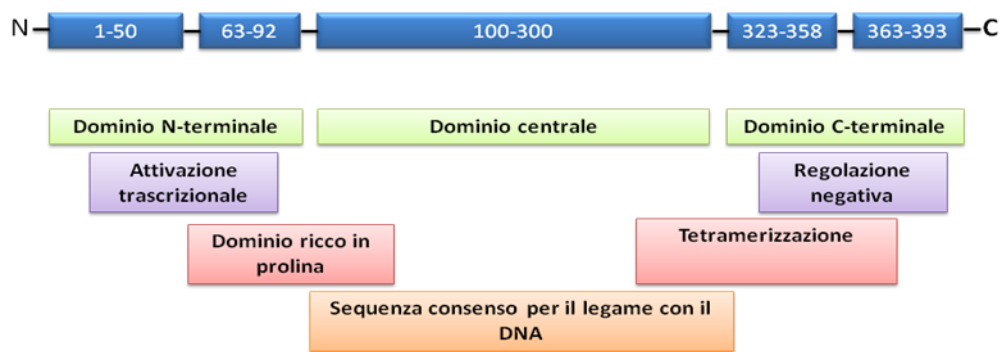


Figura 2: struttura di p53.

p53 agisce come un fattore di trascrizione che attiva o inattiva una serie di geni più a valle^{16, 17}. L'interazione tra p53 e i geni a valle avviene grazie alla capacità di p53 di legare sequenze specifiche del DNA; si tratta di sequenze consenso costituite da due copie del decanucleotide 5'Pu-Pu-Pu-C-(A/T)-(A/T)-G-Py-Py-Py-3' separate da 10-3 coppie di basi con sequenza casuale. I siti nucleotidici che legano p53 hanno, quindi, una simmetria (quattro copie dell'emisito 5'-(A/T)-G-Py-Py-Py-3' sono orientate, a due a due, in direzione opposta a formare una struttura palindromica)^{18, 19}. Questo suggerisce che la proteina p53 possa legarsi a questi siti come tetramero; risultato, questo, confermato anche da studi biofisici che indicano che la p53 in soluzione è tetramerica. La p53, tramite il suo ruolo di

attivatore della trascrizione, attiva diverse vie di segnale che possono portare alla riparazione del DNA o all'apoptosi (figura 3).

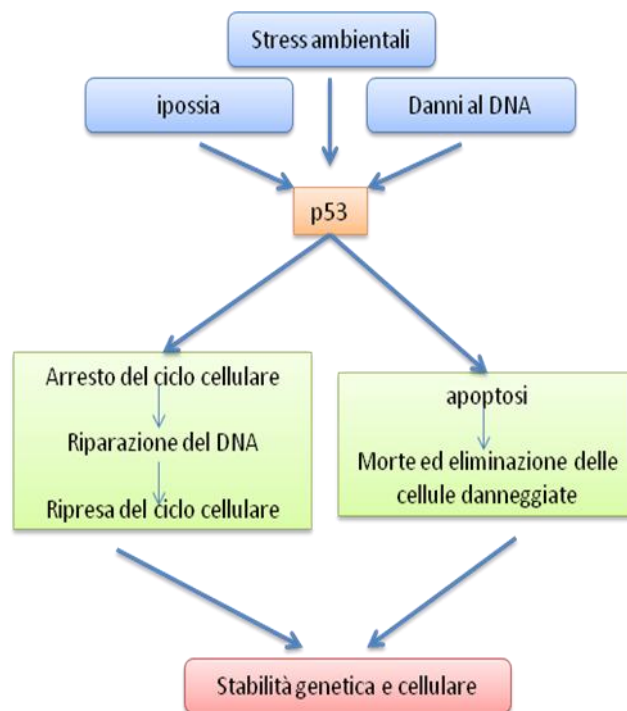


Figura 3: Programma attivato da p53 in risposta allo stress cellulare.

Regolazione di p53.

Dal momento che p53 presenta una breve emivita (circa 20 minuti), le cellule non sottoposte a stress risultano caratterizzate da bassi livelli di concentrazione della proteina. Tuttavia, quando la cellula subisce un danno, si assiste ad una soppressione dell'ubiquitinazione e ad una stabilizzazione della proteina che pertanto si accumula all'interno del nucleo ². Più in dettaglio si ha che, in condizioni di normalità, la degradazione di p53 è sotto il controllo di una proteina nota come mdm2, che agisce da regolatore negativo assicurando che i livelli di p53 in una cellula non sottoposta a stress siano mantenuti bassi. mdm-2 lega la p53 nel nucleo cellulare e ne blocca l'attività di fattore di trascrizione, favorendo, come detto precedentemente, la sua poli-ubiquitinazione, e quindi la sua degradazione; a seguito, invece, di stress o di danni al genoma della cellula, p53 viene fosforilata nel suo dominio N-terminale da alcune chinasi (e.g. DNA-PK e ATM) e tale fosforilazione impedisce il legame di mdm2 a p53 ^{20, 21}. Questa interazione tra la proteina p53 e la proteina mdm-2 rappresenta una delle vie principali di regolazione dell'attività di p53. mdm-2 inibisce l'attività di p53 anche agendo su un'ubiquitina ligasi E3 che indirizza la proteina stessa all'apparato di degradazione, oppure mdm-2 può agire anche indirettamente a livello della regione N-terminale di p53 inibendone l'attività transattivante. p53 induce la trascrizione di mdm-2: tra i molti geni regolati da p53 c'è proprio mdm2: si instaura pertanto un circuito a feedback negativo in cui i due componenti limitano a vicenda la loro attività.

INK4a-aRF è un locus genico importante che controlla sia p53 sia un altro oncosoppressore: RB. Il trascritto del gene INK4a-aRF viene sottoposto a

splicing alternativo per produrre due mRNA che codificano per due proteine: p16^{INK4a}, situata a monte di RB e la proteina p14^{ARF} nell'uomo (nel topo viene definita come p19^{ARF}) localizzata a monte di p53. La proteina p14^{ARF} antagonizza mdm-2 legandola e impedendo così l'ubiquitinazione di p53, che risulta stabilizzata e può accumularsi nella cellula. P14^{ARF} agisce perciò da soppressore tumorale inibendo, in ultima analisi, l'inibitore del soppressore tumorale p53² (figura 4).



Figura 4: regolazione di p53 da parte di mdm-2 e p14^{ARF}.

Gli stress ambientali che portano all'attivazione di p53 sono diversi ma tutti hanno come effetto la modificazione di amminoacidi in siti specifici della proteina. La forma più comune di modificazione è la fosforilazione di serina, meno frequentemente si verifica acetilazione di lisina. Tre vie principali sono identificate nella attivazione di p53:

1. Le radiazioni ionizzanti inducono rotture del DNA che attivano la chinasi ATM la quale fosforila S¹⁵. Le rotture del DNA attivano una chinasi DNA dipendente che agisce su altri siti nella regione N-terminale.
2. Le radiazioni UV e altri tipi di stress attivano la chinasi ATR e la caseina chinasi II che fosforilano S¹⁵, S³³ e S³⁹².
3. Alcuni segnali di crescita aberranti possono attivare p19^{ARF}, portando all'inattivazione di mdm-2 e quindi all'attivazione di p53.

I siti regolatori di queste vie si trovano nei domini regolatori terminali della proteina. Le modificazioni di p53 causate dai suddetti fattori esogeni possono influenzare la stabilità della proteina, l'oligomerizzazione, l'attacco al DNA e l'attacco ad altre proteine. p53 agisce, quindi, da sensore che integra le informazioni provenienti da molte vie, ognuna delle quali porta a modificazione di residui specifici di p53, che ne attiva la risposta. Normalmente la fosforilazione di un aminoacido può cambiare le proprietà di una proteina alterandone la struttura nelle immediate vicinanze, creando o abolendo siti che interagiscono con altre proteine, ma, in alcuni di questi siti della p53, la fosforilazione ha un effetto più vasto e cambia la conformazione dell'ossatura polipeptidica della proteina: essa passa da una conformazione "trans" (in cui aminoacidi adiacenti si trovano su lati opposti del legame polipeptidico) ad una conformazione "cis" (in cui entrambi gli aminoacidi si trovano sullo stesso lato del legame peptidico). Possiamo perciò affermare che l'attivazione di p53 è determinata da due fattori: da una parte la quantità di p53 presente nella cellula (determinata principalmente dall'attività regolatoria di mdm-2 sulla degradazione di p53), e dall'altra i cambiamenti di conformazione provocati dall'azione di uno o più sistemi sensori uno o più a seguito di eventi ambientali ².

Funzioni di p53.

Dopo l'attivazione di p53 ha inizio un programma di trascrizione genica che riflette la natura del segnale di stress. p53 induce l'espressione dei geni a valle che attivano a loro volta diverse vie di segnale che possono determinare l'arresto del ciclo cellulare e la riparazione del DNA o l'apoptosi cellulare. Quale sia il meccanismo messo in atto dalla cellula in risposta allo stress dipende, in parte, dallo stadio del ciclo cellulare che la cellula ha raggiunto in quel momento. Nelle cellule in fase G1 precoce la p53 attiva un punto di controllo che blocca l'ulteriore progresso nel ciclo cellulare, permettendo la riparazione del DNA danneggiato prima che la cellula sia entrata in fase S; se la cellula è già in fase S p53 induce la morte cellulare programmata attivando l'apoptosi. Tuttavia lo stadio del ciclo cellulare non è l'unico fattore a determinare il risultato: per esempio alcuni tipi cellulari sono più inclini di altri a reagire con una risposta apoptotica piuttosto che attivando la riparazione cellulare².

La via principale che porta all'interruzione del ciclo cellulare in G1 è mediata dall'attivazione di p21, proteina che svolge la funzione di inibitore del ciclo cellulare (CKI). p53 promuove la trascrizione del gene che codifica per p21. Quest'ultima si lega ai complessi G1/S-CdK e S-CdK (complessi proteici che svolgono un ruolo di controllo del ciclo cellulare) e li inattiva, arrestando così la cellula in G1²².

È stato dimostrato che la p53 è coinvolta in diverse modalità di riparazione del DNA: la riparazione per escissione di nucleotidi (NER), la riparazione per escissione di una base (BER), la riparazione per ricombinazione non omologa (Non-Homologous End-Joining recombination, NHEJ) e la riparazione per

ricombinazione omologa (homologous recombination, HR). Un ruolo centrale in questo senso è svolto da GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage Inducible) che svolge la funzione di proteina riparatrice impedendo l'ingresso della cellula danneggiata nella fase S²³; p53 attiva GADD45 che, dopo essersi complessata con una proteina nucleare, promuove l'azione di una DNA polimerasi coinvolta nella riparazione e replicazione del DNA; in tal modo, quindi, durante la sosta proliferativa hanno luogo i meccanismi di riparazione del materiale genetico².

La capacità di p53 di indurre l'apoptosi è meno chiara. È noto, tuttavia, che esistono due distinti meccanismi pro-apoptotici di p53. Da una parte la proteina determina la produzione di proteine pro-apoptotiche che scatenano il processo di morte cellulare programmata agendo sul mitocondrio, dall'altra è in grado di raggiungere lo stesso risultato attraverso la produzione o l'attivazione di specifici recettori di superficie cellulari (tra tutti il recettore Fas è uno dei più importanti)². Tra le proteine pro-apoptotiche si assiste alla trascrizione di componenti appartenenti alla famiglia Bcl-2 come Bax, Bak e Bad: queste ultime inducono il rilascio del citocromo c dal mitocondrio nel citosol, dove si lega ad una proteina adattatrice Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1). Apaf-1 a sua volta si lega a molecole di procaspasi-9: tale legame comporta lo scatenamento della cascata delle caspasi e quindi l'apoptosi²². Altri geni responsabili della sintesi dei principali componenti della via estrinseca di apoptosi che vengono trans-attivati da p53 sono: Fas/CD95, DR4 (death receptor 4) e DR5²³ (Figura 5).

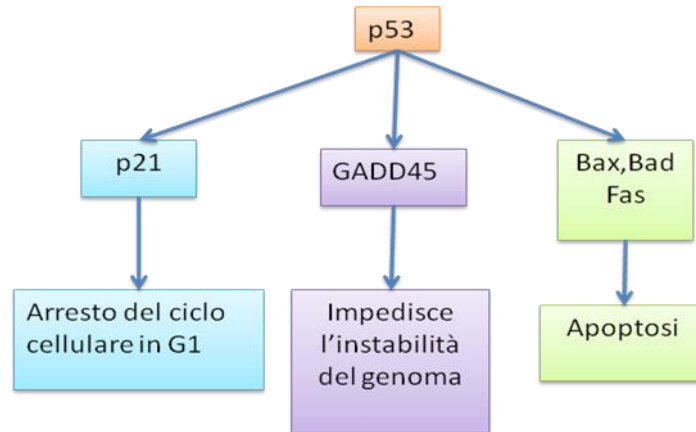


Figura 5: p53 attiva parecchie vie indipendenti. L'attivazione dell'arresto del ciclo cellulare insieme all'inibizione dell'instabilità del genoma sono un'alternativa all'apoptosi.

p53 è implicata anche nel processo di senescenza, fenomeno per il quale le normali cellule diploidi somatiche dopo un certo numero di divisioni perdono la capacità di dividersi. La perdita di p53 rappresenta un evento cruciale nel permettere alla cellula di sopravvivere e dividersi andando incontro ad un processo definito come immortalizzazione. Normalmente, quando le cellule entrano in fase di senescenza, come risultato dell'accorciamento dei telomeri, la p53 viene attivata e determina l'arresto del ciclo cellulare o l'apoptosi. L'attivazione di p53 è dovuta alla perdita della proteina TRF2 normalmente situata alle estremità dei cromosomi. TRF2 ha la funzione di proteggere le estremità telomeriche del DNA ma quando viene perduta, a causa dell'accorciamento dei telomeri, p53 può legare l'estremità sporgente 3' libera del DNA. Tale evento determina l'attivazione di p53 inducendo, come detto, l'arresto della crescita o la morte programmata della cellula ².

p53 secondo i più recenti studi svolgerebbe inoltre un ruolo primario anche in altri processi biologici come ad esempio nella regolazione del metabolismo cellulare, nel processo di invecchiamento e nella regolazione dello stato ossidativo della cellula ^{24, 25}.

Mutazioni di TP53 e neoplasie

È stato dimostrato che più della metà di tutte le neoplasie umane ha alterazioni di p53 o ha mutazioni nel gene TP53. La perdita di funzione di p53 risulta quindi essere l'alterazione più comune nelle neoplasie umane. I suoi effetti sono stati dimostrati direttamente nei topi. Si è osservato che la perdita di entrambi gli alleli di TP53 provoca l'insorgenza di tumori: con la perdita del primo allele l'incidenza di neoplasie è aumentata dal 45% all'80%, con la perdita di entrambi gli alleli si assiste ad un drastico accorciamento della durata della vita a causa dell'insorgenza di tumori praticamente nel 100% dei topi ². Mutazioni di TP53 si accumulano in molti tipi di cancro umano che colpiscono organi e tessuti notevolmente diversi e questo, probabilmente, perché la perdita di p53 conferisce un vantaggio di crescita alle cellule: vale a dire che la p53 "wild-type" limita la crescita cellulare. L'eterogeneità dei tipi di neoplasie in cui si assiste a variazioni di TP53 indica, invece, che la proteina derivata da tale gene non è implicata in un evento tessuto-specifico, ma in un meccanismo di controllo della proliferazione cellulare comune a tutti i tessuti. La p53 è definita soppressore tumorale anche per il fatto che tale proteina, nella forma "wild-type", può sopprimere o inibire la trasformazione di cellule in coltura da parte di molti oncogeni. Le cellule mutanti per p53 hanno un'aumentata propensione ad amplificare il DNA, il che probabilmente riflette il

ruolo della p53 “wild-type” nel contrastare l’instabilità del genoma che caratterizza le cellule cancerose ².

Polimorfismi di TP53 e neoplasie

Esistono dati sperimentali che associano la presenza di alcuni polimorfismi del gene TP53 ad un maggior rischio di eventi pre-neoplastici e neoplastici. È emerso, infatti, che alcuni polimorfismi comuni del DNA sono in grado di modulare un'individuale suscettibilità allo sviluppo di patologie maligne soprattutto se intercorre l'esposizione a fattori ambientali come la dieta o il fumo di sigaretta²⁶,²⁷,²⁸. Come precedentemente detto, la p53 è un soppressore tumorale in grado di esplicare la propria attività attraverso numerose vie come l'apoptosi, la riparazione del DNA e l'arresto del ciclo cellulare ed è perciò uno dei principali attori nel processo di mantenimento della stabilità genomica. È probabile che la presenza di polimorfismi genici in TP53 possa alterare la stabilità della proteina p53, diminuirne l'espressione e influenzarne le capacità funzionali quali, ad esempio, la possibilità di riparare il DNA danneggiato, la possibilità di legare le sequenze specifiche del DNA dei geni target, la capacità di interagire con altre proteine²⁹.

Queste variazioni della sequenza nucleotidica, che sono appunto i polimorfismi (soprattutto di tipo SNP), possono coinvolgere regioni codificanti e non codificanti di TP53. Esistono, inoltre, numerosi studi che indicano come la presenza di SNP in TP53 sia in grado di influenzare non solo il rischio di insorgenza di neoplasie ma anche la prognosi clinica di tali patologie maligne: la risposta di p53 è infatti cruciale non solo nella riduzione della frequenza di insorgenza del cancro, ma anche nel mediare la risposta ai principali trattamenti chemioterapici³⁰.

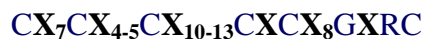
Diversi sono gli esempi di polimorfismo di TP53, riportati in letteratura, correlati ad un' aumentata predisposizione all' insorgenza di cancro. Si segnala, ad esempio, il SNP localizzato nel codone 72. L' aminoacido codificato dal codone 72 risiede in una regione ricca in prolina localizzata tra la regione di transattivazione e l' area di legame di p53 al DNA. Questa regione ricca in prolina si è rivelata essere importante per le funzioni di p53 ed in particolare per la sua abilità ad indurre l' apoptosi nella cellula danneggiata. Vari studi hanno dimostrato che due diverse isoforme di p53, che differiscono per la presenza di un SNP a livello di questo codone 72 (p53-codon72-Pro e p53-codon72Arg), non sono equivalenti dal punto di vista funzionale: l' isoforma con l' arginina presenta una maggior capacità di indurre l' apoptosi cellulare ³¹ .

In letteratura è stato notevolmente studiato è il polimorfismo IVS6+62G>A nell' introne 6 di TP53. Tale polimorfismo, pur essendo in una regione non codificante, può essere responsabile di un' alterata espressione di p53. Nel passato si erano considerate le sequenze introniche esclusivamente come materiale di scarto del genoma della cellula e quindi si era proposta la teoria che le mutazioni a livello di queste sequenze fossero del tutto ininfluenti. Ovviamente questa considerazione è divenuta obsoleta non appena sono stati identificati alcuni dei ruoli delle sequenze introniche. In definitiva quindi, non è possibile definire un ruolo o un significato per i polimorfismi intronici ma ogni caso va considerato a parte. Nel caso del polimorfismo IVS6+62G>A tale alterazione è rilevata in corrispondenza di zone regolatrici della trascrizione e quindi potrebbe essere rilevante in relazione all' espressione della p53. A tal proposito tale polimorfismo è stato associato anche con un più alto rischio di cancro del polmone ³² .

EGF: struttura e funzione

L'Epidermal Growth Factor (EGF) è un fattore di crescita membro della superfamiglia EGF³³. EGF è in grado di attivare la sintesi del DNA e la proliferazione cellulare, e di stimolare la mitogenesi nei tessuti epidermici^{34, 35}. Studi in vitro hanno dimostrato che i fattori di crescita prodotti da cellule tumorali di melanoma, incluso EGF, possono avere effetti paracrini stimolando la crescita tumorale³⁶. EGF è codificato da un trascritto mRNA da 4,8 kilobasi da un gene di 110 kilobasi di lunghezza che contiene 24 esoni ed è situato sul cromosoma 4q25. La proteina EGF, del peso molecolare di 6045 dalton, è costituita da una sequenza di 53 residui aminoacidici. La superfamiglia EGF che include anche, tra gli altri, il transforming growth factor (TGF), l' heparin-binding EGF-like growth factor, l'epiregulina, la betacellulina, l'anfiregulina e le neureguline (NRG)1-6, comprende diversi fattori di crescita che condividono tre fondamentali caratteristiche:

- Elevata affinità di legame con il recettore EGF (EGFR)
- Funzione di stimolo della mitogenesi in cellule sensibili
- Caratteristiche molecolari di tipo strutturale ed in particolare la presenza di una sequenza aminoacidica conservata (EGF-like domain) costituita da 50-60 aminoacidi corrispondente a



con 6 residui di cisteina a formare tre ponti disolfuro intramolecolari nella struttura terziaria della proteina³⁵. Tale caratteristica è alla base dell'alta affinità di legame di tutti i membri della superfamiglia EGF per il recettore EGFR³⁷. Tutti i membri della superfamiglia EGF vengono sintetizzati come precursori transmembrana che possono contenere diversi EGF-like domains all'interno della

sequenza aminoacidica ed in particolare nella porzione extracellulare della proteina. Nella specie umana il precursore di EGF comprende 1207 residui e contiene 9 EGF-like domains. Le proteine mature vengono ottenute in seguito ad un processo di proteolisi strettamente regolata e rilasciate a livello della superficie cellulare ³⁸. Le proteine della superfamiglia EGF si possono ritrovare in diversi fluidi corporei (sangue, latte, urina, saliva, liquido seminale, succhi pancreatici, liquido cerebro-spinale, liquido amniotico) ³⁹.

Il recettore EGFR

Il recettore di EGF (EGFR) è composto da una singola catena polipeptidica di 1186 residui aminoacidici e pesa circa 40 kD. Comprende un dominio extracellulare che funge da sito di legame ed un dominio intracellulare che possiede attività enzimatica tirosin-chinasica. L'organizzazione molecolare di EGFR presenta notevoli similitudini con quella dei recettori per altri noti fattori di crescita (e.g. platelet derived growth factor, insuline-like growth factor-1, colony stimulating factor, fibroblast growth factor). ³⁵

Il dominio extracellulare corrisponde alla porzione N-terminale della molecola e comprende due domini ricchi di residui di cisteina in grado di formare ponti disolfuro. A livello di questo dominio si verifica il legame ad alta affinità tra EGFR e i membri della superfamiglia EGF. Il dominio trans membrana comprende un' α -elica. Il dominio citoplasmatico corrisponde alla porzione C-terminale della proteina e possiede attività enzimatica tirosin-chinasica. A livello della porzione carbossi-terminale, infatti, sono presenti numerosi residui di tirosina dove si verifica l'autofosforilazione, oltre che residui di serina/treonina il cui significato è di tipo regolatorio sull'attività recettoriale (down-regulation) e

sull'endocitosi cellulare mediata dall'attivazione del segnale recettoriale ⁴⁰. La trasmissione del segnale, una volta stabilito il legame tra ligando e recettore, viene infatti attivata dal trasferimento di γ -fosfati derivati da ATP su residui di tirosina situati su substrati esogeni e sul dominio intracitoplasmatico di EGFR. In seguito alla fosforilazione della tirosina vengono attivate delle vie di segnale. L'EGFR fa parte di una famiglia di proteine recettoriali HER (o ErbB) composta da 4 sottotipi: HER1/EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) e HER4 (ErbB4). Tutti questi sottotipi sono in grado di interagire con i membri della superfamiglia EGF e di trasdurre il segnale all'interno della cellula. Una volta stabilito il legame ligando-recettore, una serie di complessi segnali molecolari consente la formazione di omodimeri o eterodimeri tra recettori di tipo HER. La forma monomerica di EGFR possiede un certo grado di attività catalitica di tipo tirosin-chinasico, ma tale attività è notevolmente ridotta rispetto a quella espletata dalla forma dimerica del recettore; si può pertanto affermare che se la dimerizzazione non avviene la chinasi si trova in conformazione inattiva ⁴¹. In seguito alla fosforilazione dei residui di tirosina vengono attivate numerose vie di segnale tra cui ras/MAPK e fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K)⁴².

La funzione di EGF e dei fattori EGF like e di EGFR nella fisiologia della cellula è stata a lungo studiata attraverso esperimenti *in vitro* e *in vivo*. Gli esperimenti condotti in vivo su topi neonati risalgono ai primi anni '80. Iniettando EGF e TGF α in topi neonati si assisteva ad un'anticipata apertura delle palpebre ⁴³ e a precoce sviluppo dentario ⁴⁴ oltre che a rapidi progressi dello sviluppo neuro-comportamentale degli animali. L'azione di questi fattori di crescita e dei loro recettori appare dunque strettamente correlata allo stimolo della proliferazione e differenziazione cellulare.

Superfamiglia EGF ed EGFR e cancro

L'espressione sregolata di EGF, dei membri della superfamiglia EGF e del recettore EGFR è un evento comune nella trasformazione neoplastica. Varie forme mutanti di EGFR sono state rinvenute in cellule tumorali di mammiferi (Tabella 1)⁴⁵.

Table 1
Mutations of the EGFR detected in tumour cells [36]; novel residues that occur at the splice sites are not shown*

Type	Alteration in sequence
EGFR vI	Translation starts at aa 543
EGFR vII	Deletion of aa 521-603
EGFR vIII	Deletion of aa 6-273
EGFR vIII/Δ12-13	Deletions of aa 6-273 and 409-520
EGFR vIV	Deletion of aa 959-1030
EGFR vV	Truncation at residue 958
EGFR.TDM/2-7	Tandem duplication of 6-273
EGFR.TDM/18-25	Tandem duplication of 664-1030
EGFR.TDM/18-26	Tandem duplication of 664-1014

* EGFR, epidermal growth factor receptor; aa, amino acid(s).

Tabella 1

In modo particolare l'aumentata espressione dei ligandi e/o dei recettori della superfamiglia EGF e l'attivazione sregolata del recettore EGFR in assenza dal ligando sono state descritte in diversi tumori epiteliali, tra cui gliomi, carcinoma della mammella, carcinoma del pancreas ed epatocarcinoma⁴⁶. Mutazioni di EGFR sono generalmente associate anche alla progressione dei tumori melanocitari⁴⁷. Allestendo modelli murini è stato possibile comprendere i meccanismi attraverso i quali la disregolazione dei fattori di crescita appartenenti alla famiglia EGF agisce nel favorire la progressione neoplastica. I segnali biochimici che conseguono al legame ligando-recettore tra EGF o i fattori di crescita EGF-like e il recettore EGFR attivano una serie di chinasi fino a coinvolgere proto-oncogeni come ras e c-myc, quest'ultimo oncogene molto

frequentemente amplificato nelle cellule del carcinoma mammario e in quelle dell'epatocarcinoma ⁴⁸. La cascata chinasi promossa dal legame ligando-recettore sarebbe inoltre in grado di promuovere la tumorigenesi anche grazie alla stimolazione della motilità e della migrazione cellulare. In particolare l'attivazione di vie di segnale coinvolgenti fattori quali PLC γ , MAPK, e PI3K favorisce in situazioni fisiologiche il movimento cellulare ed in situazioni patologiche può promuovere l'invasione tumorale ⁴⁹.

Polimorfismi dell'EGF

Shabhazi et Al. ⁵⁰ nel 2002 hanno analizzato la regione del gene EGF dalla posizione -1321 alla posizione 164, mediante single-stranded conformational polymorphism analysis (SSCP). L'analisi SSCP ha rivelato tre differenti pattern di bande all'elettroforesi (Figura 6).

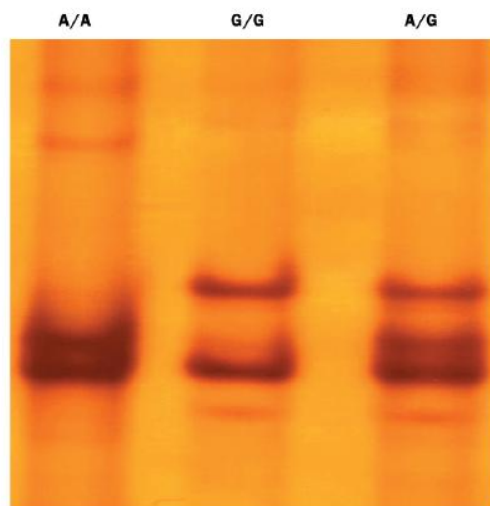


Figura 6: Analisi SSCP della regione 5-untranslated del gene EGF

Sequenziando il DNA di individui che dimostravano pattern differenti è stata identificata una sostituzione G ad A in posizione 61. A queste nuove sequenze sono stati assegnati i numeri EMBL (European Molecular Biology Laboratory) AJ131611 e HSA13611. In seguito è stata messa in relazione la produzione di EGF con i differenti genotipi. E' risultato evidente che gli individui omozigoti per 61*A producono meno EGF degli individui con genotipo G/G ($p=0.0004$) o G/A ($p=0.001$) (figura 7).

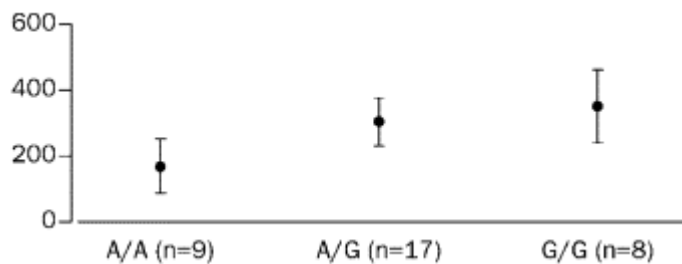


Figura 7: Produzione media di EGF in cellule mononucleate in cultura nei tre differenti gruppi allelici. $p(G/G \text{ vs } A/A)=0.0004$, $p(A/G \text{ vs } A/A)=0.001$, $p(G/G \text{ vs } A/G)=0.097$.

Rimane ancora da chiarire come i differenti genotipi influenzino la produzione di EGF. A tal proposito sono state formulate alcune ipotesi: un legame di NF-B al sito del polimorfismo mediante DNA footprinting, oppure la sostituzione G – A potrebbe influenzare il ripiegamento del DNA o il processing del trascritto mRNA. Un'altra possibilità è che la variazione allelica in posizione 61 si associ strettamente ad un polimorfismo funzionale localizzato altrove nel gene. Shabhazi

et Al. nello stesso lavoro hanno individuato una correlazione significativa tra l'omozigosi per l'allele EGF 61*G e lo sviluppo del melanoma maligno (figura 8)

EGF polymorphism	Controls (n=99)	Malignant melanoma patients (n=135)	Odds ratio (95% CI)	p
Genotype				
A/A	32 (32.3%)	21 (15.6%)	1.0	..
A/G	47 (47.5%)	50 (37.0%)	1.6 (0.8–3.2)	0.162
G/G	20 (20.2%)	64 (47.4%)	4.9 (2.3–10.2)	<0.0001
Allele				
A	111 (56.1%)	92 (34.1%)	1.0	..
G	87 (43.9%)	178 (65.9%)	2.7 (1.9–4.0)	<0.0001

Figura 8: Genotipo EGF e frequenze alleliche in pazienti con melanoma maligno e controlli sani

Inoltre l'allele 61*G è risultato significativamente associato con aumentato spessore di Breslow, in particolare il genotipo G/G è risultato essere più frequente in pazienti con tumore spesso almeno 3,5 mm che in quelli il cui tumore era meno spesso di 3,5mm (odds ratio 3.7 [95% CI 1.0–13.2], p=0.045 (Figura 9)

EGF polymorphism	Breslow thickness score			
	In situ (n=24)	0.1–1.5 mm (n=74)	1.5–3.5 mm (n=18)	≥3.5 mm (n=12)
Genotype				
A/A	6 (25.0%)	10 (13.5%)	4 (22.2%)	1 (8.3%)
A/G	8 (33.3%)	31 (41.9%)	5 (27.8%)	2 (16.7%)
G/G	10 (41.7%)	33 (44.6%)	9 (50.0%)	9 (75.0%)*
Allele				
A	20 (41.7%)	51 (34.5%)	13 (36.1%)	4 (16.7%)
G	28 (58.3%)	97 (65.5%)	23 (63.9%)	20 (83.3%)†

*p=0.045 for difference between G/G genotype and A/A and A/G genotypes combined in tumours with a Breslow thickness of ≥3.5 mm vs <3.5 mm.

†p=0.010 for difference between G allele and A allele in tumours with a Breslow thickness of ≥3.5 mm vs <3.5 mm.

Figura 9: Associazione tra genotipo EGF e frequenza allelica con spessore di Breslow in pazienti affetti da melanoma maligno.

L'importanza di EGF nella patogenesi del melanoma è supportata da dati che dimostrano che EGF è espresso dalle cellule del melanoma e può stimolare la loro proliferazione, con meccanismo autocrino o paracrino ⁵¹. La progressione tumorale nei melanociti è caratterizzata da un'incrementata autonomia di crescita e da esigenze minori di fattori di crescita pur con un aumentato uso di polipeptidi di crescita esogeni incluso EGF ⁵². Studi *in vivo* hanno inoltre dimostrato che l'aumentata espressione di EGFR correla con la progressione del melanoma ⁵³. È stato inoltre osservato che bloccare EGFR con anticorpi neutralizzanti aumenta la suscettibilità alla citolisi mediata da tumour necrosis factor delle cellule di melanoma uveale ⁵⁴, inibisce le metastasi, e aumenta la sopravvivenza. McCarron et Al. nel 2003 ⁵⁵ hanno condotto uno studio nel quale non sono risultate evidenti differenze significative nel genotipo EGF, studiato sul DNA estratto dalle biopsie diagnostiche dei tumori asportati, tra i pazienti affetti da melanoma e i controlli

sani. In questo lavoro è stata dimostrata una correlazione debole tra aumentata produzione di EGF (genotipo G/G) e spessore di Breslow maggiore di 3,5 mm (30.0% vs. 9.8%, $p = 0.03$). I dati pubblicati nel 2004 da Amend et Al.⁵⁶ non supportano un'associazione significativa tra sviluppo di melanoma o aumentato spessore di Breslow e presenza dell'allele 61*G o omozigosi G/G per il gene EGF. James et Al.⁵⁷ non hanno trovato una correlazione tra il polimorfismo dell'EGF e lo sviluppo di melanoma. Questo studio ha tuttavia dimostrato che i soggetti omozigoti per l'allele G hanno tumori caratterizzati da maggiore spessore di Breslow ($p=0,05$). Gli autori hanno anche evidenziato che non vi è una correlazione statisticamente significativa tra genotipo EGF e numero totale di nevi melanocitici. Randerson-Moor et Al.⁵⁸ hanno evidenziato una correlazione tra l'allele G e diminuito spessore di Breslow (Odds Ratio 0.5, 95% CI 0.3-0.9), in contrasto con gli studi precedenti. In questo lavoro non è risultata alcuna correlazione tra genotipo EGF e sviluppo di melanoma maligno, numero di nevi o nevi atipici.

Nevi melanocitici e dermatoscopia

La dermatoscopia, chiamata anche microscopia ad epiluminescenza, microscopia cutanea di superficie e dermoscopia è una metodica diagnostica non invasiva che permette di esaminare in vivo le lesioni cutanee pigmentate. Essa permette di aumentare l'accuratezza diagnostica delle lesioni pigmentate cutanee mediante la visualizzazione di alcune strutture non altrimenti visibili ad occhio nudo⁵⁹. Infatti, molti studi hanno ormai dimostrato che la dermatoscopia aumenta del 10-30% la sensibilità diagnostica rispetto alla diagnosi clinica ad occhio nudo, a patto che il clinico segua un training che gli permetta di applicare questa tecnica in modo efficace^{60, 61}. La tecnica consiste nel porre un sottile strato di olio da immersione, alcol o acqua sulla lesione cutanea che verrà esaminata utilizzando un dermatoscopio manuale, uno stereomicroscopio, una telecamera o un sistema digitale di acquisizione d'immagine. L'ingrandimento di questi strumenti ha un range che va da 6x a 40x e talora può arrivare fino a 100x. Lo standard maggiormente utilizzato prevede un ingrandimento 10x. Il liquido posto sulla superficie della lesione cutanea elimina la porzione della luce riflessa dallo strato corneo e quindi consente la visualizzazione delle strutture epidermiche, della giunzione dermo-epidermica e del derma superficiale⁵⁹. Inoltre, questa tecnica permette di visualizzare i caratteri morfologici dei vasi del plesso capillare superficiale. Gli strumenti usati comunemente per l'esame dermatoscopico e l'acquisizione delle immagini sono il dermatoscopio manuale, il Dermaphot, lo stereomicroscopio, il videodermatoscopio. Il **dermatoscopio manuale** permette un'analisi delle lesioni pigmentate facile e rapida. La lente sferica acromatica,

abbinata ad un fascio di luce alogeno, consente un ingrandimento di 10 volte ed il terminale a contatto permette di mettere correttamente a fuoco il 100% dell'area osservata. Si tratta di uno strumento economico rispetto ad altri apparecchi. Tuttavia, bisogna anche considerare i limiti di questa pratica consistenti nell'impossibilità di modificare intensità luminosa e ingrandimento, e di effettuare un follow-up delle lesioni del paziente in quanto è impossibile memorizzare e studiare retrospettivamente le immagini ⁵⁹. Il **dermaphot** consiste in un particolare obiettivo che se montato su una macchina fotografica convenzionale o una reflex digitale permette di ottenere immagini dermatoscopiche di elevata qualità ad un ingrandimento di 10 volte. Tuttavia, anche con questo mezzo non è possibile modificare l'ingrandimento e l'intensità luminosa dell'immagine acquisita ⁵⁹. Grazie ad una avanzata ottica binoculare capace di ottenere una visione tridimensionale e qualitativamente elevata di strutture epidermiche e subepidermiche, lo **stereomicroscopio** risulta essere lo strumento migliore anche per i forti ingrandimenti che può realizzare (da 6 a 40 volte). Esso fornisce diverse intensità luminose e consente la connessione sia a strumenti fotografici digitali che a telecamere per l'archiviazione e stampa delle immagini. I limiti di questo strumento sono i tempi lunghi d'impiego e la struttura ingombrante, oltre ai costi elevati e alla indaginoso acquisizione delle immagini ⁵⁹. Il **videodermatoscopio** consiste in una telecamera a colori ad alta risoluzione incorporata al termine di un manipolo, che permette di visualizzare in modo indiretto su di un monitor lesioni cutanee pigmentate: grazie ad un computer connesso al sistema, le immagini si possono facilmente digitalizzare e memorizzare, consentendo, così, un facile, continuo e preciso follow-up del paziente. La diagnosi dermatoscopica delle lesioni pigmentate cutanee si basa su alcuni algoritmi quali l'analisi di pattern, la

regola dell'ABCD dermoscopic e la "7-point checklist". Tutti questi metodi si basano sul riconoscimento di alcuni criteri dermoscopic al fine del raggiungimento di una diagnosi morfologica delle diverse lesioni pigmentate⁶². Con l'uso di tali criteri diagnostici, la dermatoscopia ha dimostrato chiaramente di aumentare in modo significativo l'accuratezza diagnostica delle lesioni pigmentate della pelle⁶⁰.

Pigment Network (rete pigmentaria)

Il pigment network si presenta come una rete delicata e regolare di linee pigmentate di color brunoastro che sovrastano un fondo marrone chiaro. Istologicamente, la rete pigmentaria corrisponde alla melanina presente nei cheratinociti o ai melanociti presenti nello strato basale dell'epidermide⁵⁹. Dal momento che l'epidermide è una struttura tridimensionale e la visione dermoscopic offre al contrario una visione orizzontale (cioè su due piani), la "rete ridge" pigmentata della pelle appare come un reticolo. L'epidermide al di sopra delle papille dermiche è relativamente sottile, contiene meno melanina e di conseguenza si evidenzia con l'aspetto di spazi brunastri. Al contrario, la parte di epidermide compresa tra le maglie del reticolo è più spessa e quindi contiene più pigmento dando origine così alle linee bruno-scuro osservabili con il dermoscopio⁶³. Quindi, la regolarità e la simmetria della forma e delle dimensioni della rete ridge determina in definitiva la simmetria del reticolo pigmentario. La regolarità del reticolo è determinata comunque, anche dalla concentrazione di melanina all'interno degli spazi interpapillari; quando la concentrazione di melanina è uniforme all'interno degli spazi interpapillari, il reticolo appare regolare. Ogni processo che altera la giunzione dermoepidermica produce alterazioni nel reticolo pigmentario. Quando la giunzione

dermoepidermica o il derma papillare è infiltrato da cellule infiammatorie o cellule neoplastiche, come nel caso di certi nevi di Clark e melanomi, il reticolo pigmentario ne risulta alterato con una più o meno marcata asimmetria. Allo stesso modo, un reticolo ispessito è il risultato di un aumentato numero di melanociti pigmentati organizzati in nidi nel contesto di un derma papillare ispessito e può essere suggestivo di melanoma ⁶³. In dermatoscopia, la presenza di un reticolo pigmentario è altamente indicativa di una lesione melanocitaria, indipendentemente dal suo comportamento biologico. Quindi, è l'aspetto qualitativo del reticolo pigmentario ad indirizzare verso la benignità o la malignità di una lesione melanocitaria. Una lesione caratterizzata da una rete a maglie strette e regolari distribuita uniformemente nel contesto della lesione e che sfuma gradualmente alla periferia generalmente è benigna (per esempio un nevo melanocitico acquisito comune, un dermatofibroma, una lentigo solare, una lentigo simplex e una cheratosi seborroica). Al contrario, una lesione caratterizzata da una rete nera, marrone o grigia, a maglie irregolari, distribuita più o meno disomogeneamente nel contesto della lesione, ispessita e soprattutto che s'interrompe bruscamente alla periferia, ha elevata probabilità di trattarsi di melanoma. Quando una lesione sfuma simmetricamente alla periferia tende ad essere benigna indipendentemente dalle alterazioni che possono interessare la porzione centrale ⁶³. Quando il reticolo pigmentario è presente su la quasi totalità della lesione si parla di pattern reticolare ⁵⁹. La rete pigmentaria varia in relazione alla sede anatomica in cui è situata la lesione. Di notevole interesse è la particolare morfologia del reticolo pigmentario nel volto che appunto prende il nome di pseudoreticolo pigmentario del volto: questo tipo di reticolo deriva proprio dalla anatomia della cute del volto, caratterizzata dalla presenza di follicoli piliferi e

priva dell'alternanza fra creste interpapillari epidermiche e papille dermiche, e consiste in maglie rotondeggianti di diametro uniforme corrispondenti ai preesistenti osti follicolari. Il pseudoreticolo può essere osservato nella lentigo solare, nella cheratosi seborroica reticolata, nel nevo di Miescher e nel melanoma in situ ⁵⁹. A livello palmo-plantare, in relazione alle caratteristiche anatomiche specifiche di queste aree, tipicamente la pigmentazione può essere disposta lungo i solchi oppure le creste cutanee, ma in taluni casi può essere distribuita secondo una direzione ortogonale rispetto a tali strutture anatomiche. Questa particolare disposizione del pigmento legata all'anatomia della cute acroposta è appunto responsabile del pattern parallelo all'osservazione dermatoscopica ⁶⁴. Esistono diverse varianti morfologiche del pattern parallelo: nei nevi melanocitici acrali si osserva il pattern a solchi paralleli, il pattern a rete di metallo e il pattern fibrillare, mentre il pattern a creste parallele è altamente suggestivo per un melanoma in situ o invasivo in fase iniziale delle sedi acrali ⁶⁴.

Punti e globuli:

I punti (dots) e i globuli (globules) sono strutture circolari piccole, ben circoscritte, di colore nero o marrone o blu-grigio. I black dots e i black globules rappresentano focali aggregati di melanociti nello strato corneo o melanina libera tra i cheratinociti o melanofagi. I Black dots e i black globules generalmente tendono ad essere localizzati al centro in una lesione benigna, mentre nei melanomi tendono ad essere variabili per forma e dimensione e a disporsi irregolarmente all'interno della lesione, in particolare vicino alla periferia ⁶⁴. I brown dots rappresentano melanina o melanociti nella parte più bassa dell'epidermide. I brown globules rappresentano nidi di melanociti pigmentati nella giunzione dermoepidermica o nel derma papillare. I brown dots e i brown

globules sono regolari nelle dimensioni e hanno distribuzione centrale nelle lesioni benigne ⁶⁴. In definitiva, la dimensione e morfologia dei punti / globuli riflettono l'estensione e la forma di questi aggregati pigmentari, mentre il colore dipende dal livello anatomico in cui queste strutture si localizzano. Le strutture pigmentate nello strato corneo sono nere, alla giunzione dermoepidermica sono marroni e nel derma papillare grigio-blu ⁵⁹. Recentemente, sono stati descritti anche i globuli rossi, cioè delle strutture ovali o rotondeggianti di colore rossastro e per lo più distribuiti in piccoli aggregati. La correlazione istopatologica non è chiara; presumibilmente corrispondono a teche di melanociti non pigmentati nel derma e rappresentano un parametro utile per la diagnosi di melanoma ⁵⁹. In ultima analisi, si parla di pattern globulare quando i globuli sono presenti in gran parte della lesione; tale pattern è di frequente riscontro nel nevo melanocitico acquisito comune, nel nevo di Unna e si può riscontrare anche nei nevi congeniti (spesso in associazione con il pattern reticolare) e in alcune cheratosi seborroiche. Una variante è il pattern ad acciottolato che è costituito da strutture globulari aggregate, di grandi dimensioni, per lo più di morfologia poligonale; tale pattern risulta altamente specifico per la diagnosi dei nevi dermici papillomatosi; talvolta si può riscontrare nei nevi congeniti e nelle componenti dermica di un nevo melanocitico acquisito comune composto ⁵⁹.

Strie radiali e pseudopodi

Istologicamente le strie radiali e i pseudopodi rappresentano nidi confluenti di melanociti pigmentati all'interno dell'epidermide e della giunzione dermoepidermica. La forma allungata e lineare delle strie è una prova del fatto che le teche giunzionali di melanociti pigmentati formano strutture tubulari

parallele alla superficie cutanea anche se sarebbe necessaria una ricostruzione tridimensionale per confermare questa ipotesi ⁵⁹.

Benché sia le strie che gli pseudopodi abbiano gli stessi correlati istopatologici, a causa della loro differente morfologia, tuttavia, essi sono considerate entità distinte da alcuni dermatoscopisti. Le strie radiali appaiono come strutture lineari di colore marrone-nero non chiaramente associate con le linee del reticolo pigmentario, mentre gli pseudopodi appaiono come delle estensioni digitiformi nella parte periferica della lesione ⁶⁵. Le strie (intendendo con tale termine sia le strie radiali che gli pseudopodi) possono essere regolari o irregolari, più o meno convergenti e possono essere osservate su tutta una lesione, benché risultino più facili da individuare quando situate alla periferia. Le strie possono essere ritrovate sia nelle lesioni melanocitarie benigne che maligne: è la loro disposizione generale piuttosto che la morfologia di una singola stria ad indirizzare la diagnosi. Infatti, quando le strie sono distribuite in modo irregolare nel contesto di una lesione, sono altamente indicative di melanoma, mentre quando sono distribuite radialmente in modo simmetrico sull'intera circonferenza della lesione sono suggestive di nevo di Reed/Spitz. Nel nevo di Reed/Spitz la presenza di strie radiali distribuite radialmente alla periferia della lesione dà origine al pattern dermatoscopico "starburst" ("a stella che scoppia"), altamente specifico appunto di queste lesioni. Tuttavia, anche il melanoma può avere talvolta caratteri morfologici simili e ciò rappresenta una delle più temibili possibilità di errore diagnostico ^{63, 66}.

Velo blu biancastro

Il velo blu-biancastro è una pigmentazione diffusa, di colore dal grigio-blu al blu-biancastro, associato ad altre strutture quali la rete di pigmento, i punti/globuli e le strie. I correlati istopatologici del velo blu-biancastro sono un'ortocheratosi compatta, una più o meno pronunciata ipergranulosi e un'epidermide acantotica sovrastante una vasta area contenente melanina, con nidi di melanociti intensamente pigmentati nel derma superficiale. Il velo blu-biancastro si trova quasi esclusivamente nel melanoma maligno e nei nevi di Spitz/Reed ⁶⁷. Molti Autori ritengono che una differenziazione tra velo blu biancastro del melanoma e quello dei nevi di Spitz e Reed non sia possibile sulla base del solo aspetto dermatoscopico ^{66, 68}. In definitiva, i nevi di Spitz/Reed possono essere considerati a tutti gli effetti dei possibili simulatori clinici, dermoscopici e istopatologici del melanoma; nella diagnosi differenziale ci si dovrà in questo caso basare anche su informazione anamnestiche quali l'età d'insorgenza (i nevi di Spitz e Reed sono più tipici dell'età infantile) e la presenza/assenza di modificazioni cliniche nel tempo ⁶⁹. La presenza del velo blu biancastro, comunque, è un utile parametro nella diagnosi differenziale tra melanoma e nevo di Clark, dal momento che nel nevo di Clark tale caratteristica non è generalmente presente ⁶⁹.

Pigmentazione

Con il termine pigmentazione s'intende un'area diffusa da marrone scuro a grigio-nero che ostacola il riconoscimento di altre strutture dermatoscopiche come la rete pigmentaria. Il significato diagnostico della pigmentazione è limitato. Una pigmentazione regolare localizzata e regolare diffusa indica un processo benigno, mentre una pigmentazione irregolare localizzata o diffusa è suggestiva di

malignità ⁶⁷. La pigmentazione è il criterio dermatoscopico che può mostrare più variazioni morfologiche, come testimoniato dai vari sinonimi utilizzati, quali estensioni irregolari, “blotches” e lamella nera. Il correlato istopatologico delle varie forme di pigmentazione è un’intensa pigmentazione melanica che interessa tutta l’epidermide e/o il derma superficiale ⁵⁹.

Ipopigmentazione

L’ipopigmentazione è un’area localizzata o diffusa meno pigmentata rispetto alle altre aree della lesione. La presenza di ipopigmentazione ha un limitato valore diagnostico dal momento che può essere ritrovata sia nei nevi di Clark sia, anche se raramente, nel melanoma. Istopatologicamente, l’ipopigmentazione rappresenta un’area di ridotto contenuto melaninico nell’epidermide o nel derma ⁶⁷.

Strutture di regressione

Il fenomeno della regressione, frequentemente osservato nel melanoma, si esprime dermatoscopicamente con aree bianche o blu o con la combinazione dei due colori. Le aree bianche, chiamate anche aree bianche simil-cicatriziali, corrispondono ad aree bianche più o meno ben definite che assomigliano ad una cicatrice superficiale. Le aree blu, chiamate anche aree grigio blu, peppering, o punti multipli blu-grigi sono focali aree punteggiate o diffuse di colorazione grigio-blu o grigia ⁶⁷. La presenza di aree bianche, di aree blu e soprattutto la combinazione delle due sono criteri dermatoscopici piuttosto specifici per la diagnosi di melanoma ⁷⁰. Tuttavia, le strutture di regressione possono essere ritrovate anche nei nevi di Clark. La differenziazione tra nevo di Clark e melanoma in regressione può essere difficile sia dermatoscopicamente che istologicamente. I segni di regressione possono essere ritrovati anche nella

cheratosi lichenoidi benigna o nella cheratosi attinica pigmentata che possono anch'essi quindi simulare sia dermatoscopicamente che istologicamente il melanoma ⁵⁹. Dal punto di vista istologico, le aree bianche corrispondono a fibrosi nel contesto di un derma papillare ispessito, mentre le aree blu rappresentano l'accumulo di melanofagi nel derma papillare ⁷¹. Infine, è utile sottolineare che spesso è facile confondere le aree bianche e blu di regressione con il velo blu-biancastro, da cui effettivamente è di difficile se non impossibile distinzione ⁵⁹.

Strutture vascolari

Numerose strutture vascolari distinte possono essere osservate mediante l'indagine dermatoscopica. Si distinguono: vasi a virgola, vasi a ghirlanda, vasi arborizzati, vasi a forcina, vasi puntiformi, vasi lineari irregolari e vasi nelle aree di regressione. I vasi a virgola si possono osservare soprattutto nei nevi melanocitici, specialmente nei nevi dermici, ma raramente anche nel melanoma. I vasi a ghirlanda si ritrovano solamente nelle iperplasie sebacee. I vasi arborizzati si osservano comunemente nei carcinomi basocellulari, ma anche nelle cheratosi seborroiche e più raramente nei nevi e nel melanoma. I vasi a forcina sono comunemente trovati nel melanoma e nelle cheratosi seborroiche, ma talvolta anche nel carcinoma basocellulare, nel cheratoacantoma e nei nevi melanocitici. I vasi puntiformi (vasi perpendicolari alla superficie cutanea) si ritrovano in tutti i tipi di lesioni melanocitiche, talvolta nelle cheratosi seborroiche e raramente nel carcinoma basocellulare. I vasi lineari irregolari (paralleli alla superficie cutanea) sono relativamente comuni nel melanoma, soprattutto se di spessore maggiore di 0.75 mm e raramente possono essere ritrovati nei nevi melanocitici. I vasi nelle aree di regressione si possono osservare frequentemente nelle aree bianche del melanoma in regressione ⁵⁹. Dal punto di vista istologico, il comune denominatore

di queste strutture è la presenza di neovascolarizzazione; infatti, i vasi lineari corrispondono alla neoangiogenesi nel derma superficiale, mentre i vasi puntiformi corrispondono alla neovascolarizzazione nel derma profondo ⁶⁷.

Pseudocisti cornee

Si tratta di strutture rotondeggianti di dimensioni variabili e di colore bianco o bianco-giallastro (ma talvolta sono pigmentate e quindi tali da assomigliare a dei globuli) che si possono ritrovare in maniera predominante nelle cheratosi seborroiche. Tuttavia possono essere ritrovate nei nevi dermici papillomatosi e nei nevi congeniti. Molto raramente le pseudocisti cornee possono essere presenti nei nevi melanocitici e nel melanoma. Dal punto istopatologico corrispondono a globuli di materiale corneo intraepidermico ⁵⁹.

Sbocchi simil-comedonici

Gli sbocchi simil-comedonici sono strutture rotonde od ovali di colore marrone-giallastro o marrone-nero che vengono ritrovate soprattutto nelle cheratosi seborroiche e nei nevi dermici papillomatosi. Gli sbocchi simil-comedonici di forma irregolare vengono anche chiamati cripte irregolari. Dal punto di vista istopatologico corrispondono a tappi di cheratina localizzati all'interno delle invaginazioni dell'epidermide e degli sbocchi follicolari dilatati. Spesso, per la presenza di melanina e di colonie batteriche, questi tappi di cheratina hanno un colore marrone-giallastro o nero ⁵⁹.

Strutture papillari esofitiche

Le strutture papillari esofitiche sono strutture a forma di cupola, strettamente giustapposte, comunemente separate da sbocchi simil-comedonici di colore nero,

anche chiamati cripte irregolari. Le strutture papillari esofitiche sono comunemente trovate nei nevi dermici papillomatosi (nevi di Unna) e nelle cheratosi seborroiche. Molto raramente tale strutture possono essere trovate nel melanoma. Dal punto di vista istopatologico corrispondono a proiezioni digitiformi che rispecchiano la pronunciata papillomatosi ed acantosi delle cheratosi seborroiche o le strutture papillari digitiformi dei nevi papillomatosi costituite da nidi più o meno pigmentati di melanociti ⁵⁹.

Lacune rosse

Le lacune rosse appaiono come aree ovali o rotondeggianti, più o meno ben delimitate, di colore rossastro, rosso blu o variabile dal rosso scuro al nero. Tali strutture sono patognomoniche degli emangiomi e degli angiocheratomi . Istologicamente corrispondono a spazi vascolari dilatati localizzati nel derma superficiale. Le lacune rosse con una colorazione che va dal rosso scuro al nero corrispondono a spazi vascolari in parte o del tutto trombizzati ⁵⁹.

Aree a foglia d'acero

Le aree a foglia d'acero sono chiazze marroni , grigio-marroni o grigio-nerastre che rivelano una configurazione a foglia d'acero. Tali aree sono patognomoniche del carcinoma basocellulare pigmentato, specialmente quando associate con i vasi arborizzati. Istologicamente corrispondono ad aggregati solidi di cellule basalioidi più o meno pigmentate localizzati nel derma papillare in un carcinoma basocellulare di tipo superficiale o nodulare ⁵⁹.

Chiazza bianca centrale

La chiazza bianca centrale è il reperto dermatoscopico patognomonico del dermatofibroma. Essa appare come un' area relativamente ben circoscritta, rotonda od ovale, talora irregolare, di colore bianco porcellana inserita al centro di una lesione con pigmentazione regolare. Talvolta, nel contesto della chiazza bianca centrale è possibile osservare piccoli punti/globuli di colore marrone chiaro⁵⁹. Dal punto di vista istologico tale struttura può corrispondere ad una riduzione del contenuto della pigmentazione melanica nello strato basale dell'epidermide. Tuttavia, non essendo noto l'impatto della proliferazione fibroistiocitaria del dermatofibroma sull'epidermide sovrastante, non è possibile fornire una spiegazione di questo particolare aspetto clinico e dermatoscopico⁵⁹.

Patterns dermatoscopici tipici dei nevi melanocitici benigni

La dermatoscopia si è rivelata un utile strumento nella diagnosi differenziale tra lesioni pigmentate benigne e maligne, aumentando in tal modo l'accuratezza diagnostica del melanoma^{72, 73, 74}. La differenziazione dermatoscopica delle lesioni maligne pigmentate (cioè, il melanoma e il carcinoma basocellulare pigmentato) è basata sulla presenza o assenza di patterns dermoscopici specifici. Per esempio, la presenza di un velo grigio-blu, pseudopodi o strie radiali sono caratteristiche altamente specifiche di melanoma; aree a foglia d'acero e vasi arborizzati sono, invece, tipici del carcinoma basocellulare pigmentato. Quindi, tutte le lesioni pigmentate che hanno queste caratteristiche devono essere considerate come potenzialmente maligne; tuttavia, non tutte le lesioni maligne hanno queste caratteristiche che invece talora possono essere presenti in quelle

benigne. Perciò, le classiche strutture associate con le lesioni maligne sono di aiuto solo quando presenti ⁶⁷. Altri criteri per distinguere le lesioni benigne da quelle maligne sono la simmetria e la regolarità della colorazione e di alcune caratteristiche dermatoscopiche. In genere, le lesioni benigne tendono ad essere simmetriche e contengono uno o due colori, mentre le lesioni maligne sono asimmetriche con multipli colori. Inoltre, le strutture dermatoscopiche delle lesioni benigne tendono ad essere regolari in forma e dimensione e uniformemente distribuite sulla superficie della lesione stessa. Al contrario, le lesioni maligne tendono ad avere strutture dermatoscopiche di forma e dimensione irregolari e distribuite in modo casuale all'interno della lesione. Quindi, è importante conoscere le caratteristiche dermatoscopiche delle lesioni benigne per poterle in tal modo distinguerle dal melanoma ⁶⁷.

Nevi Melanocitici Acquisiti

Tra i nevi melanocitici sono inclusi: i nevi melanocitici comuni, i nevi atipici, il nevo di Spitz, il nevo blu e l'Halo nevus.

Nevi melanocitici comuni

I nevi melanocitici comuni possono comparire nell'infanzia, nell'adolescenza o più tardi in età adulta. Essi appaiono come macule pigmentate dal marrone al nero, spesso più scure al centro e sfumate alla periferia. Possono rimanere maculari o divenire cupoliformi, cerebriformi o papule peduncolate o noduli. Questi nevi aumentano in numero e dimensione fino alla terza decade di vita per

poi successivamente andare incontro a regressione. Questi nevi consistono in cluster di nevomelanociti proliferanti nella giunzione dermoepidermica (nevi giunzionali) , nel derma (nevi dermici) oppure sia nelle giunzione dermoepidermica che nel derma (nevi composti) ⁶⁷.

- Caratteristiche cliniche:

I nevi melanocitici comuni consistono in lesioni rotonde od ovali ben definite con un diametro tra 2 e 6 mm, spesso, ma non sempre pigmentate. I nevi giunzionali hanno un profilo piano, un colore che va dal marrone chiaro al marrone scuro, sono simmetrici e hanno una trama sottile. La parte centrale è generalmente più scura della periferia, dove, invece, si può osservare una progressiva sfumatura. I nevi composti sono leggermente rilevati o papillomatosi ed hanno una colorazione che va dal marrone chiaro al marrone scuro. Durante l'adolescenza questi nevi diventano generalmente più spessi, cambiano colore e talvolta compaiono peli terminali. Quando questi ultimi compaiono, la diagnosi differenziale con i nevi congeniti piccoli risulta difficile. I nevi dermici sono lesioni papulari o nodulari, sessili o peduncolati con colorazione marrone chiara e presentano talvolta teleangectasie e peli terminali. Ne esistono due varianti di nevi dermici: il nevo di Unna e il nevo di Miescher. I nevi di Unna sono lesioni polipoidi o sessili comunemente localizzate al tronco, collo, spalle o braccia. I nevi di Miescher sono lesioni cupoliformi, di colore variabile dal bruno chiaro fino a quello della cute normale, situata quasi esclusivamente sul viso, di consistenza teso-elastica ⁶⁷.

- Caratteristiche dermatoscopiche:

I nevi melanocitici comuni possono avere una o più di queste caratteristiche dermatoscopiche: una rete pigmentaria, globuli, punti e aree senza strutture. Il

velo grigio-blu, le strie radiali e gli pseudopodi sono sempre assenti. Generalmente i nevi giunzionali hanno una rete pigmentaria a nido d'ape distribuita in modo uniforme ed omogeneo. Le linee che costituiscono la rete hanno un colore che va dal marrone chiaro al marrone scuro e sono regolari in larghezza e lunghezza. La rete spesso è più scura al centro della lesione e sfuma gradualmente alla periferia. La rete pigmentaria nella parte centrale della lesione spesso è oscurata dall'intensa pigmentazione. Inoltre, talvolta, possono essere presenti punti neri e globuli ⁶⁷. I nevi composti mostrano alcune caratteristiche dei nevi giunzionali come una rete pigmentaria a nido d'ape e la pigmentazione centrale. Tuttavia, nei nevi composti la rete pigmentaria appare meno prominente e la pigmentazione centrale meno intensa. Un altro pattern comunemente ritrovato nei nevi composti è il pattern globulare, nel quale i globuli sono distribuiti in modo omogeneo e uniforme nel contesto della lesione. Quando questi globuli sono larghi e strettamente essi danno origine ad un pattern ad acciottolato. Rispetto ai nevi giunzionali e composti, i nevi dermici hanno di gran lunga meno caratteristiche dermatoscopiche. Questi nevi non hanno né rete pigmentaria né punti neri, ma presentano punti e linee rosse che corrispondono a vasi sanguigni dilatati. A causa della mancanza di pigmentazione i nevi dermici appaiono all'osservazione dermatoscopica come noduli del colore della pelle con superficie liscia o papillomatosa ⁶⁷

Di particolare importanza è il fatto che il melanoma amelanotico può apparire alla dermatoscopia come un nevo dermico; in questo caso sarà importante ricercare altre caratteristiche dermatoscopiche come punti e globuli irregolari, e una rete pigmentaria non uniforme alla periferia ⁷⁵. I nevi di Unna hanno un pattern globulare con grandi globuli angolati e strutture papillari esofitiche talvolta

separate da sbocchi similcomedonici nerastri. I nevi di Miescher hanno una pseudorete che consiste di nidi di nevociti disposti attorno ad aperture follicolari preesistenti e non presentano strutture cerebriformi. Nel caso di lesioni non intensamente pigmentate è possibile osservare numerose strutture vascolari a virgola, specialmente in periferia, che rendono agevole la diagnosi differenziale con il carcinoma basocellulare nodulare ⁶⁷.

Nevi atipici

I nevi atipici sono proliferazioni melanocitiche acquisite e benigne della pelle. La definizione clinica di tali lesioni è controversa. In generale, confrontati con i nevi melanocitici acquisiti comuni, i nevi atipici possono avere una o tutte le caratteristiche dell'ABCD: A- forma asimmetrica; B- bordi irregolari; C- più colori; D: diametro maggiore di 6 mm. I nevi atipici vengono chiamati anche B-K mole (B e K sono le iniziali dei cognomi delle prime due persone con nevi atipici associati a melanoma familiare), FAMM (familial atypical mole melanoma), nevo displastico e nevo di Clark ⁶⁷.

- Caratteristiche cliniche:

I nevi atipici possono avere uno o tutti i criteri dell'ABCD. Quindi, un nevo atipico può avere forma asimmetrica, bordi irregolari, colori multipli o un diametro maggiore di 6 mm. Tali lesioni sono in genere piane, ma talora possono essere mammellonate o papulari. Inoltre, presentano una elevata variabilità morfologica, tale per cui spesso può risultare difficile la diagnosi differenziale con il melanoma; in questi casi è necessario ricorrere alla biopsia e all'esame istologico per chiarire la reale natura della lesione ⁶⁷.

- Caratteristiche dermatoscopiche:

La dermatoscopia si è dimostrata di importanza determinante nel differenziare i nevi atipici dal melanoma ⁷⁶. Prima dell'introduzione della dermatoscopia vi erano notevoli difficoltà nella diagnosi differenziale tra nevi atipici e melanoma e quindi era frequente il ricorso alla biopsia e all'esame istologico per la conferma diagnostica ⁷⁷.

In base alla presenza o assenza di talune caratteristiche dermatoscopiche, le lesioni melanocitiche sospette possono essere suddivise in tre categorie: 1) *Nevi Atipici* (benigni), 2) *Melanoma*, 3) *lesioni di diagnosi incerta*. Mentre per la prima categoria non è prevista la biopsia e la seguente conferma istologica, invece per il melanoma e le lesioni di diagnosi incerta la biopsia deve essere necessariamente eseguita per la conferma diagnostica. In questo modo la dermatoscopia identificando i nevi atipici (che sono benigni!) può evitare escissioni inutili ⁶⁷. L'esame dermatoscopico dei nevi atipici spesso rivela una rete pigmentaria, globuli, punti, ed aree senza struttura. Raramente possono essere osservati pseudopodi, strie radiali e strutture di regressione. Rispetto ai nevi melanocitici comuni, le caratteristiche dermatoscopiche nei nevi atipici sono più irregolari in forma e dimensione e non sono distribuite in modo uniforme all'interno della lesione. Il grado di irregolarità e non uniformità influenza in modo determinante la diagnosi e il trattamento di queste lesioni atipiche. Il melanoma dovrebbe essere sospettato quando la lesione contiene più colori, pseudopodi, strie radiali, strutture di regressione o un velo grigio-blu ⁶⁷. I due pattern dermatoscopici comunemente visti nei nevi atipici sono quello reticolare e quello globulare. Il pattern reticolare è il più comune ed è caratterizzato dalla presenza di una rete pigmentaria prominente con maglie sottili e regolari che sfuma alla periferia. La

rete pigmentaria può essere più o meno omogenea nel contesto della lesione e le linee del reticolo risultano leggermente variabili in larghezza e spessore. Questo pattern assomiglia a quello dei nevi giunzionali, con la differenza che in tal caso la rete è più irregolare in distribuzione e spessore ⁶⁷.

Esistono quattro varianti di questo pattern reticolare:

- 1- Rete pigmentaria alla periferia della lesione con iperpigmentazione centrale: tale aspetto definisce il nevo ipermelanotico. L'area iperpigmentata centrale a contorni irregolari viene chiamata "lamella nera".
- 2- Rete pigmentaria alla periferia della lesione con un'area di ipopigmentazione centrale
- 3- Rete pigmentaria alla periferia della lesione con un'area di globuli e dotti al centro della lesione
- 4- Rete pigmentaria a chiazze interrotta da aree di iper/ipo-pigmentazione multifocali.

Il pattern globulare è meno frequente di quello reticolare; esso è caratterizzato da numerosi punti/globuli di forma e diametro variabile distribuiti in modo uniforme alla periferia della lesione. La parte centrale della lesione è, invece, spesso costituita da un tipico pattern reticolare ⁶⁷.

Nevo di Spitz/Reed

Il nevo di Spitz insorge tipicamente nell'infanzia, ma può comparire anche in età adulta; utilizzando la dizione istopatologica può essere anche chiamato nevo a cellule epitelioidi o fusate ⁷⁸. Il nevo di Reed insorge più frequentemente in

soggetti di sesso femminile nella seconda o terza decade di vita; la sua dizione istopatologica è di nevo pigmentato a cellule fuse.

- *Caratteristiche cliniche:*

Il nevo di Spitz generalmente si presenta come una papula di 2-8 mm di diametro, di colore rossastro. La superficie cupoliforme è liscia, di colore uniforme e presenta teleangectasie. La localizzazione più frequente è al volto anche se può essere presente anche in altre parti del corpo ⁷⁸. Il nevo di Reed ha colore bruno scuro o nero e prevale agli arti inferiori; anch'esso ha forma papulosa rotondeggiante o ovalare, talvolta nodulare, raramente papillomatosa, con superficie liscia, cheratosica o verrucosa ⁷⁸.

- *Caratteristiche dermatoscopiche:*

Le caratteristiche dermatoscopiche dei nevi di Spitz e Reed sono molto simili tanto da renderli talvolta indistinguibili ⁶⁷. Il riconoscimento di talune caratteristiche dermatoscopiche aumenta l'accuratezza diagnostica dei nevi di Spitz dal 56% (solo osservazione clinica) al 93% (con l'ausilio della dermatoscopia) ⁶⁶. Dal punto di vista dermatoscopico nel 50% dei casi i nevi di Spitz presentano il pattern starburst; tale pattern è costituito da una pigmentazione diffusa prominente, di tonalità che varia dal grigio blu al nero e strie localizzate alla periferia della lesione con un tipico aspetto "stellato" o radiato. Tipica è la presenza al centro della lesione di un velo nero-biancastro o blu-biancastro detto anche reticolo pigmentario invertito. Nel 25% dei casi i nevi di Spitz possono presentare un pattern globulare, simmetrico, con una pigmentazione centrale di tonalità variabile dal marrone al grigio-bluastro distribuita regolarmente ed una caratteristica corona di grandi globuli marroni alla periferia. Globuli e punti di tonalità marrone o grigio-bluastro possono a volte estendersi su tutta la superficie

della lesione. Nel caso di nevi di Spitz scarsamente pigmentati è possibile reperire anche un pattern vascolare punteggiato ⁷⁹. In un altro 25% dei casi dei nevi di Spitz, è presente un aspetto dermatoscopico atipico, dovuto ad una distribuzione disomogenea ed asimmetrica di colori e strutture dermatoscopiche. Quando sono presenti tali caratteristiche la biopsia è sempre procedura consigliabile. Tuttavia, in tal caso risulta di notevole importanza nell'orientamento diagnostico preoperatorio la storia di insorgenza della lesione in età infantile oppure la mancanza di modificazioni cliniche nel tempo. E' importante allo stesso modo ricordare che talora il melanoma può presentare caratteristiche dermatoscopiche perfettamente sovrapponibili a quelle del nevo di Spitz (pattern starburst, ecc.); per questo motivo, nel caso di nevi insorgenti in età adulta e che si sono modificati di recente, anche se presentano i classici patterns dermatoscopici dei nevi di Spitz, è consigliabile l'asportazione chirurgica e l'esame istologico.

Nevo blu

Il nevo blu è una lesione pigmentata di colore blu o blu-nero, acquisita o talvolta congenita, prevalentemente acroposta, caratterizzata istologicamente da melanociti dendritici, fusati o ovali, localizzati nel derma. Si possono riconoscere tre sottotipi di nevi blu: il nevo blu comune, il nevo blu cellulare e il nevo blu combinato ⁶⁷.

Caratteristiche cliniche:

I nevi blu comuni sono lesioni ben circoscritte, cupoliformi, di diametro spesso minore di 1 cm. Hanno una colorazione omogenea marrone-bluastro, grigio-bluastro o anche grigio-nerastro. I nevi blu cellulari hanno un diametro maggiore

ed una superficie irregolare. I nevi combinati sono nevi blu sovrapposti ad un altro nevo melanocitico acquisito o congenito ⁶⁷.

Caratteristiche dermatoscopiche:

Dal punto di vista dermatoscopico i nevi blu presentano un tipico pattern omogeneo costituito da una pigmentazione blu diffusa e omogenea che interessa l'intera lesione. Non sono presenti globuli marroni, né punti neri, né reticolo. I contorni del nevo blu sono in genere ben definiti e non sono presenti pseudopodi e strie radiali ⁶⁷. L'assenza di pattern dermatoscopici nel contesto della pigmentazione diffusa omogenea del nevo blu è spiegata dal fatto che istologicamente i nevi blu sono localizzati quasi esclusivamente in sede intradermica con una piccola zona di risparmio immediatamente al di sotto dell'epidermide ⁵⁹.

E' importante ricordare che in taluni casi il nevo blu può comportarsi come simulatore del melanoma nodulare; allo stesso modo alcuni melanomi possono non venire escissi perché considerati nevi blu ⁵⁹.

Halo Nevus

L'Halo nevus o nevo con alone o nevo di Sutton è un nevo melanocitico circondato da un'area ipopigmentata o depigmentata ⁶⁷.

Caratteristiche cliniche:

Il nevo di Sutton generalmente è simmetrico, rotondo od ovale ed ha un'ampiezza che può andare da pochi mm a pochi cm. Prevalde sul tronco negli adolescenti e

nei giovani adulti. Il numero per individuo è variabile, da poche unità fino a 100. La parte centrale del nevo può gradualmente scomparire, lasciando un'area di depigmentazione che successivamente viene ripigmentata a partire per lo più dalla periferia ⁶⁷.

Caratteristiche dermatoscopiche:

Il pattern caratteristico dell'halo nevus è la presenza di una corona bianca che circonda un'area centrale priva di strutture caratteristiche di colore marrone chiaro. Occasionalmente possono essere osservati punti e globuli pigmentati. I globuli neri indicano nidi di melanociti nella giunzione dermoepidermica o nel derma papillare ⁶⁷.

Nevo ricorrente

Il nevo melanocitico ricorrente o persistente è una lesione di non infrequente osservazione che compare in sede di incompleta escissione di un nevo congenito o acquisito e che talvolta può simulare clinicamente ed istologicamente un melanoma. L'incompleta escissione è legata all'utilizzo di tecniche non corrette tra cui laser, diatermocoagulazione e crioterapia e comporta la permanenza di melanociti nella sede della primitiva lesione che possono andare successivamente incontro a proliferazione dando origine ad una lesione per lo più di pochi mm, di colore scuro-nerastro, di forma irregolare, con contorni poco definiti, asimmetrica, simulante il melanoma (pseudomelanoma) ⁵⁹.

La diagnosi può essere facilitata dalla presenza di tessuto cicatriziale nel contesto della lesione o da una storia positiva per asportazione chirurgica di un nevo nella

stessa sede della lesione. Di cruciale importanza è ricordare che la principale diagnosi differenziale deve essere posta con il melanoma persistente/recidivante⁵⁹.

Caratteristiche dermatoscopiche:

I nevi ricorrenti sono caratterizzati dalla presenza di un pattern omogeneo o polimorfo con pigmentazione variabile dal marrone scuro al nero. Talora si possono osservare una rete di pigmento atipica, strie e punti neri irregolari. Nei casi dubbi è sempre consigliabile l'asportazione chirurgica per evitare di misconoscere un melanoma ricorrente⁵⁹.

Nevo combinato

Il nevo melanocitico combinato è una lesione pigmentata caratterizzata dalla coesistenza in una singola lesione di due o più nevi melanocitici acquisiti e/o congeniti⁵⁹.

Caratteristiche cliniche:

Il nevo combinato appare costituito da due componenti diverse che si palesano per la diversa colorazione. Il più delle volte un nevo combinato è costituito da un nevo blu e da un nevo di Clark, o da un nevo blu e un nevo di Spitz. Tuttavia sono possibili le più svariate combinazioni, tra cui quella recentemente descritta tra nevo di Spitz e nevo Spilus. Importante è considerare che un nevo combinato può simulare un melanoma insorto su un nevo preesistente: da ciò deriva che nei casi dubbi è consigliabile l'asportazione chirurgica⁵⁹.

- *Caratteristiche dermatoscopiche:*

Indipendentemente dalla composizione del nevo combinato l'architettura globale della lesione è caratterizzata da un pattern polimorfo. Nel caso vi sia l'associazione tra nevo blu e nevo melanocitico acquisito piano l'aspetto dermatoscopico è quello di una pigmentazione di colorito bluastro associato ad un reticolo pigmentario. Se invece l'associazione avviene con un nevo melanocitico atipico e il reticolo risulta irregolare e disposto in modo asimmetrico alla periferia della lesione, il nevo combinato può simulare un melanoma: in tal caso è d'obbligo l'asportazione chirurgica. Ovviamente, a seconda della composizione del nevo combinato, si potranno osservare le caratteristiche dermatoscopiche proprie di ogni componente⁵⁹.

Lentigo

Le lentigo che hanno una certa rilevanza diagnostica dal punto di vista dermatoscopico sono la lentigo simplex, la lentigo reticolare, e la lentigo solare. La *lentigo simplex* o *lentiggine* è una piccola macula pigmentata piana, acquisita o congenita, caratterizzata istologicamente da un aumentato numero di melanociti nello strato basale dell'epidermide in singole unità. Viene considerata il precursore dei nevi acquisiti di tipo giunzionale. Può essere presente come elemento isolato o in più unità; talora può fare parte di un quadro di lentiginosi, che sono sindromi complesse caratterizzate da lentiggini diffuse ed anomalie multiple e anche neoplasie.

Clinicamente si presentano come piccole macule di pigmentazione uniforme, di colore marrone chiaro o marrone scuro, con contorni ben definiti con un diametro di pochi mm. Possono comparire in ogni area cutanea, comprese le regioni palmoplantari, le mucose, le congiuntive e le zone di passaggio mucocutanee. Interessano sia la cute fotoesposta che non soprattutto in soggetti con carnagione chiara. In età avanzata le lentiggini tendono progressivamente a scomparire come gli altri nevi melanocitici. Dermatoscopicamente, la lentigo simplex è caratterizzata da una rete di pigmento tipica, a trama sottile e maglie regolarmente distribuite, che corrisponde ad una rete ridge allungata e moderatamente pigmentata⁵⁹. La *lentigo reticolare* rappresenta un tipo di lentigo solare fortemente pigmentata che può simulare il melanoma in situ. Clinicamente si presenta come una lesione di colore nero scuro a bordi neri ed irregolari; è situata prevalentemente al dorso di soggetti con fototipo I o II e una storia di severe ustioni solari. Dal punto di vista dermatoscopico è caratterizzata da un pattern reticolare bizzarro e asimmetrico con una rete pigmentaria a trama ispessita e maglie larghe⁵⁹. La *lentigo solare* (detta anche lentigo senile o macchia senile) è una lesione pigmentata acquisita piana, isolata o più spesso multipla che compare su cute fotodanneggiata. Viene considerata precursore della cheratosi seborroica di tipo reticolare. Clinicamente si presenta come una macula di dimensioni variabili da pochi mm a più di 1 cm, di colore variabile dal marrone chiaro al marrone scuro, di forma rotonda o angolata, bordi spesso indentati e superficie talvolta lievemente desquamante. Possono comparire sul viso, sul dorso delle mani, sul décolleté, sulle superfici estensorie degli avambracci e sulla parte alta del dorso. L'incidenza aumenta con l'età come conseguenza di un'incrementata esposizione alla luce solare: sono poco comuni prima dell'età di

40 anni e sempre quasi presenti nelle persone anziane ⁵⁹. Dermatoscopicamente, le lentigo solari localizzate al dorso delle mani, sulla superficie estensoria delle braccia e sul dorso sono caratterizzate da un pattern reticolare a bordi netti costituito da un reticolo a trama sottile e maglie regolari. La morfologia delle lentigo solari del viso è correlata alla particolare anatomia della cute di tale sede. In taluni casi è presente uno pseudoreticolo associato ad una delicata rete di pigmento classico. Più di frequente, si può osservare un pattern omogeneo combinato ad un delicato e tipico pseudoreticolo di colore marrone chiaro. In alcune circostanze, il bordo della lesione può presentare una caratteristica “morsicatura” concava ⁵⁹.

Melanosi Labiali e Genitali

Le melanosi labiali e genitali sono lesioni melanocitarie benigne singole o multiple che tendono alla confluenza. Possono essere ritrovate a livello della mucosa orale, del labbro inferiore, della vulva e del pene. Benché benigne possono entrare in diagnosi differenziale con il melanoma in situ e talora per chiarire la natura della lesione è necessario ricorrere alla biopsia incisionale ⁵⁹. Ci sono alcuni autori che ritengono però, che le melanosi possano essere precursori del melanoma ⁸⁰. *Caratteristiche cliniche:*

La melanosi labiale è presente solitamente nel labbro inferiore e si presenta come una macula rotonda od ovale, ben circoscritta, di colore bruno chiaro. Le melanosi genitali, invece, sono costituite da elementi maculari multipli che possono avere dimensioni fino a 2 cm, a contorni irregolari e di colore bruno disomogeneo. Per

queste lesioni è previsto uno stretto follow-up ed eventualmente la biopsia con relativo esame istologico ⁵⁹.

- *Caratteristiche dermatoscopiche:*

Le melanosi sono caratterizzate da una pigmentazione diffusa con un particolare aspetto parallelo costituito da strie lineari o parzialmente curvilinee di colore variabile dal marrone chiaro al marrone scuro ⁵⁹.

Patterns dermatoscopici tipici di lesioni non melanocitiche

Carcinoma basocellulare

E' considerato la neoplasia primitiva maligna più comune nell'uomo. Sono per lo più lesioni innocue poiché la loro crescita è lenta; tuttavia se non trattati possono determinare una progressiva distruzione dei tessuti locali con infiltrazione e compromissione di strutture vitali ⁵⁹.

Caratteristiche cliniche:

Dal punto di vista clinico-patologico si possono distinguere quattro varietà di carcinoma basocellulare: nodulare, superficiale, morfeiforme e fibroepiteliale. Tale lesione appare come una papula o un nodulo perlaceo la cui superficie è solcata da fini teleangectasie. Talora, si presenta ulcerata. In rari casi, i carcinomi basocellulari risultano fortemente pigmentati per la presenza di melanina all'interno degli aggregati di cellule basalioidi simulando un melanoma ⁵⁹.

Caratteristiche dermatoscopiche:

Segno dermatoscopico tipico dei carcinomi basocellulari sono i vasi arborizzati. Il carcinoma basocellulare pigmentato è caratterizzato comunemente da un pattern polimorfo o globulare. Altro segno dermoscopico tipico sono le aree a foglia

d'acero situate generalmente alla periferia della lesione. Talora il carcinoma basocellulare può presentare caratteristici punti/globuli di colore grigio-blu o aree pigmentate grigiastre a margini irregolari ⁵⁹.

Cheratosi seborroica

Neoplasia cutanea epiteliale benigna molto frequente ⁵⁹.

Caratteristiche cliniche:

In genere si presentano come macule marroni a margini ben definiti non rilevate. Successivamente possono assumere aspetto polipoide con superficie papillomatosa. Le cheratosi seborroiche danno l'impressione di essere appoggiate sulla cute con una superficie verrucosa ed untuosa. Il colore è variabile dal giallo sporco al marrone opaco ⁵⁹.

Caratteristiche dermatoscopiche:

Si possono distinguere tre varianti di cheratosi seborroica ognuna avente peculiari caratteristiche dermatoscopiche. La *variante acantosa* presenta pseudocisti cornee e sbocchi simil-comedonici. La colorazione è variabile dal marrone chiaro al marrone scuro, al nero. Possono essere presenti vasi a forcina e vasi puntiformi. Nel caso in cui le lesioni abbiano superficie moriforme, in dermatoscopia mostrano le cosiddette strutture papillari esofitiche. In questo tipo di cheratosi seborroiche è assente il reticolo pigmentario anche se talora alla periferia se ne possono ritrovare piccoli foci. Ancora, un aspetto globale di tipo cerebriforme costituito da strutture dermoscopiche denominate giri e solchi può costituire il quadro morfologico di una cheratosi seborroica di tipo acantoso. I giri corrispondono alle strutture papillari esofitiche mentre i solchi corrispondono

istologicamente, come gli sbocchi simil-comedonici, ad accumuli di cheratina⁵⁹. La diagnosi può essere più difficile in due varianti di cheratosi seborroica acantosa: il *melanoacantoma*, la cui colorazione intensa copre le altre caratteristiche dermatoscopiche e la *cheratosi seborroica irritata*, in cui la presenza di squamo-croste maschera i criteri diagnostici⁵⁹. La *variante reticolare* presenta un pattern reticolare⁵⁹. La *variante ipercheratosica* presenta un quadro dermoscopico aspecifico per la presenza di accumuli di cheratina e alla marcata orto-ipercheratosi che mascherano le altre caratteristiche morfologiche⁵⁹.

Lesioni vascolari

Talora le lesioni vascolari possono entrare in diagnosi differenziale con il melanoma. Di una certa rilevanza dal punto di vista dermatoscopico sono l'emangioma, l'angiocheratoma e l'emorragia subcornea. Queste lesioni hanno come tratto comune il colore rosso, rosso-blu o rosso-nero, in assenza di reticolo pigmentario e di altre caratteristiche specifiche di melanoma⁵⁹. In dermatoscopia, gli emangiomi presentano un pattern lacunare che consiste in numerose aree ovali o rotondeggianti di colore variabile dal rosso al rosso-bluastrò chiamate lacune rosse⁵⁹. L'angiocheratoma è caratterizzato anch'esso da un pattern lacunare o polimorfo costituito da numerose aree ovali o rotondeggianti ben circoscritte, di colore rosso, rosso-bluastrò, rosso scuro o nero. Tali lacune rosse insieme alle aree cheratosiche bianco-giallastre costituiscono un reperto assai suggestivo per la diagnosi. Altra caratteristica dermoscopica di frequente osservazione nell'angiocheratoma è il velo biancastro legato all'acantosi epidermica con ipergranulosi e ortocheratosi compatta⁵⁹. L'emorragia subcornea si osserva frequentemente sul calcagno di soggetti che praticano attività sportive come il calcio, il basket o il tennis. Dal punto di vista dermatoscopico presenta un pattern

globale omogeneo o globulare. Talora può presentare invece un pattern parallelo per la disposizione del pigmento ematico lungo le creste della cute glabra: in questo caso entra in diagnosi differenziale con il melanoma acrale in situ, diagnosi che può essere chiarita solamente per mezzo di una biopsia e successivo esame istologico⁵⁹.

MELANOMA MALIGNO

Il melanoma cutaneo è un tumore maligno che origina dai melanociti della cute, delle mucose e dai melanociti che costituiscono i nevi e, molto più raramente, da melanociti posti in sede extra-cutanee (occhio, orecchio interno, meningi ecc.). L'incidenza di tale neoplasia è in continuo aumento e tale patologia rappresenta oggi un importante problema per la salute pubblica. In Italia l'incidenza è stata valutata pari a 12-14 casi/anno/100.000 abitanti. Tassi di incidenza 3-4 volte superiori si osservano in Australia, negli Stati Uniti e in alcune popolazioni del Nord Europa⁷⁸. Negli Stati Uniti l'incidenza del melanoma maligno dal 1973 al 2002 è aumentato del 270% e dati raccolti e pubblicati dalla Mayo Clinic nel 2007 affermano che tra la popolazione americana 1 persona su 63 incorre nell'insorgenza del melanoma maligno nell'arco della propria vita⁸¹. Colpisce prevalentemente soggetti di razza bianca, con uguale distribuzione nei due sessi⁷⁸. A differenza di quanto avviene per la maggior parte delle altre neoplasie solide, dove l'età avanzata è quella più colpita, il melanoma interessa soprattutto soggetti giovani ed adulti. L'età media di questi pazienti si aggira intorno ai 57

anni e l'età media di morte intorno ai 67 anni. L'incidenza del melanoma maligno aumenta in modo lineare a partire dall'età di 15 anni fino ai 50 anni per poi decrescere. Circa la metà dei casi di melanoma maligno colpiscono pazienti di età compresa tra i 35 e i 65 anni. Le sedi più colpite sono il dorso negli uomini e gli arti inferiori nelle donne, mentre arti superiori e volto sono colpite con uguale frequenza. La razza bianca ha approssimativamente un rischio 10 volte maggiore di incorrere in tale neoplasia rispetto alla popolazione nera e asiatica. Il melanoma extracutaneo (e.g. melanoma delle mucose) è, invece, più comune nella popolazione che non appartiene alla razza bianca⁷⁸. Il melanoma maligno è una neoplasia molto aggressiva con un elevato potere di metastatizzazione. Gli organi più frequentemente coinvolti dalle metastasi sono cute, sottocute, linfonodi (42-58%), polmoni (18-36%), fegato (14-36%), cervello (12-20%) e ossa (10-12%)⁷⁸. Il Melanoma maligno è una malattia complessa nella quale intervengono fattori ambientali e fattori genetici. Il melanoma è una neoplasia che origina dalla trasformazione e proliferazione dei melanociti, che normalmente risiedono nello strato cellulare basale dell'epidermide. Il melanoma cutaneo primario può insorgere su una lesione preesistente detta precursore del melanoma (per esempio la lentigo maligna, un nevo displastico o congenito), oppure direttamente su una zona di cute apparentemente sana⁸². Le cellule del melanoma sono caratterizzate da una relativa autonomia di crescita in coltura. È stato pertanto suggerito un meccanismo autocrino di stimolazione della crescita, che agisce attraverso la secrezione di fattori di crescita peptidici endogeni, quali il fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF), il fattore di crescita delle piastrine (PDGF), il fattore di crescita trasformante alpha (TGF-alpha), il TGF-b o interleukina -1 (IL-1)⁸³

La crescita del melanoma può essere bifasica o monofasica. Il modello bifasico consiste in una fase di crescita iniziale (intraepidermica) orizzontale o radiale, seguita da una successiva fase di crescita verticale, che corrisponde all'infiltrazione del derma e dell'ipoderma. I melanomi che seguono il modello di crescita bifasico sono i melanomi a diffusione superficiale e i melanomi tipo lentigo maligna. Molto spesso, anche i melanomi acrali lentiginosi seguono il modello di crescita bifasico. Il modello di crescita monofasico del melanoma consiste in una crescita esclusivamente verticale ed include sostanzialmente la forma di melanoma detta melanoma nodulare. La fase di crescita verticale può includere la variante desmoplastica e il melanoma tipo a variazione minima. I fattori di rischio per il melanoma sono molteplici. Il principale fattore di rischio è costituito dall'alto numero di nevi melanocitici^{84, 85, 86}. Il rischio di sviluppare un melanoma aumenta in maniera pressoché lineare con l'aumentare del numero di nevi melanocitici. Numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato un rischio relativo da 8 a 10 volte più elevato in soggetti che presentano più di 100 nevi melanocitici sulla superficie corporea⁸⁷. E' stato provato che il melanoma familiare è geneticamente eterogeneo⁸⁸ e loci di suscettibilità al melanoma familiare sono stati individuati sul braccio corto del cromosoma 1p e del cromosoma 9p, attraverso studi di delezioni omozigoti. Molteplici eventi genetici sono stati correlati alla patogenesi del melanoma⁸⁹. E' noto che uno dei fattori di rischio più significativi per sviluppare un melanoma è una storia familiare positiva per questa malattia. Si stima che circa il dieci per cento dei casi di melanoma si presenti in pazienti con familiari di primo o secondo grado affetti da questa malattia⁹⁰. Il locus CDKN2A è responsabile della suscettibilità nel 25-40% delle famiglie con melanoma familiare⁹¹, mentre mutazioni di CDK4 sono state

individuate solo in 3 famiglie con predisposizione al melanoma ⁹². Questi due geni codificano rispettivamente p16 e la cyclin-dependent kinase 4. Queste proteine svolgono una funzione regolatoria nella stessa pathway regolatoria del ciclo cellulare, la transizione G1 ad S regolata da pRb. Mutazioni attivanti in CDK4 sono oncogeniche poiché questa kinasi regola negativamente pRb fosforilandola, provocando il rilascio di fattori di trascrizione della famiglia E2F. Al contrario p16 è un oncosoppressore e normalmente inibisce l'attività kinasica di CDK4. Le mutazioni di CDKN2A e di CDK4 sono rare ma ad alta penetranza. Il gene che codifica CDKN2A è situato a livello di 9p21. Si tratta di un gene oncosoppressore che codifica per p16 ⁹³ (inibitore di CDK4, che fosforilando pRB la inattiva permettendo il rilascio di E2F, responsabile del passaggio dalla fase G1 a S del ciclo cellulare). Sono state descritte numerose mutazioni, le più frequenti delle quali portano ad inattivazione della proteina. La mutazione è rara (0,01% nella popolazione generale) ed è ad alta penetranza. Il rischio di melanoma aumenta se la mutazione di CDKN2A si accompagna a quella di MC1R, ARF e ad esposizione a radiazioni UV. Mutazioni a carico di CDKN2A sono state riscontrate a livello germinale (AD) e somatico, e possono essere responsabili del melanoma familiare e del melanoma sporadico. Mutazioni a carico di CDK2A si possono riscontrare in numerosi tumori solidi, in particolar modo tumori pancreatici). Sono stati descritti due polimorfismi (C500G, C540T) a tipo 3' UTR polymorphism ⁹⁴ associati ad aumentato rischio di melanoma (RR=1,7 in C540T p<0,01, C500G ns). Entrambi i polimorfismi sono associati a più rapida progressione dal momento della diagnosi allo sviluppo di metastasi (p<0,007). Inoltre sono stati individuati due polimorfismi nella regione 39 non tradotta dell'esone 3 di CDKN2A (540C3G and 580C3T) ⁹⁵. CDK4 è localizzato a livello

12q13. Si tratta di un oncogene della pathway dell'Rb/E2F. È una mutazione ad alta penetranza. La mutazione è stata riscontrata solo in 3 famiglie, tutte sul codone 24. Si suppone che tali mutazioni causino l'incapacità di CDK4 a legare p16. Questo provoca una diminuzione dell'inibizione di CDK4 da parte di CDKN2A-p16. La presenza di numerosi marker di segregazione del cromosoma 9 con il melanoma familiare hanno spinto a cercare altri geni presenti su tale cromosoma che potessero giocare un ruolo nella predisposizione a questo tumore. Uno dei primi candidati è stato il gene p14ARF. Lavori recenti hanno dimostrato che la mutazione di ARF è un fattore indipendente di predisposizione al melanoma e ai tumori del sistema nervoso. ARF è situato a livello di 9p21. E' il prodotto di un trascritto alternativo codificato dal locus CDKN2A. Il locus CDKN2A è unico nei mammiferi, in quanto da origine a due proteine completamente diverse tra loro tramite uno splicing alternativo e la traduzione dei prodotti in reading frames differenti. Si tratta di un oncosoppressore che regola la stabilizzazione di p53 inibendo HDM2. E' una mutazione ad alta penetranza, indipendente dalla mutazione di CDKN2A. Sono stati descritti polimorfismi a tipo delezione, mutazione o inserzione. La mutazione di p14 ARF si associa a tumori del sistema nervoso centrale. Come già detto, tra i maggiori fattori di rischio per lo sviluppo di melanoma vi è la presenza di un elevato numero di nevi melanocitici, il colore dei capelli e degli occhi, il fototipo. Il gene che codifica per il recettore 1 della melanocortina (MC1R) è localizzato in posizione 16q24.3. Codifica per un recettore transmembrana associato a G-protein che lega l' α -MSH. Questo legame provoca un aumento del c-AMP e questo causa uno switch tra la produzione di feomelanina a eumelanina, un fattore determinante nel fenomeno dell'abbronzatura. La variante R151C di MC1R è responsabile della maggior

parte dell'effetto sul rischio di melanoma. Le varianti associate al melanoma sono risultate essere indipendenti dal fototipo secondo Fitzpatrick. Inoltre il locus MC1R modifica il rischio di melanoma nelle famiglie con mutazioni di CDKN2A^{96, 97}. Il gene che codifica per la glutathione S-transferase (GSTM1) codifica per un enzima che catalizza la detossificazione di vari composti, inclusi alcuni epossidi potenzialmente cancerogeni. Individui privi di tale sistema di detossificazione sono maggiormente predisposti a sviluppare neoplasie. Sono stati individuati tre polimorfismi: GST-M1, GST-T1, GST-P1. I polimorfismi di GST non correlano con l'incidenza del melanoma. In uno studio⁹⁸ è stato dimostrato GST-M1 (null gene) correla con aumentato spessore di Breslow (>2,5 mm), con più rapida progressione tumorale e con la variante nodulare. Il citocromo p450 possiede potenziale di detossificazione di alcuni composti lipofili o di attivazione di alcuni di essi in forme cancerogene. Per questo motivo mutazioni del citocromo p450 sono associate ad aumentata suscettibilità genetica allo sviluppo di tumori di vario genere, incluso il melanoma. Ci sono tre polimorfismi ben documentati del locus della debrisoquina idrossilasi (CYP2D6): delezione genica, mutazione dello splice site e delezione di nucleotide nella regione codificante. Gli omozigoti per la delezione risultano metabolizzatori lenti di svariate sostanze chimiche. I dati in letteratura sono contrastanti per quanto riguarda la relazione tra CYP2D6 e insorgenza di melanoma^{99, 100}. E' noto che la vitamina D ha effetti antiproliferativi e di differenziazione. Polimorfismi di questo gene portano variazioni alla concentrazione sierica del calcitriolo. L'allele più raro (polimorfismo *Fok I*) è risultato più frequente nei casi di melanoma rispetto ai controlli, ($p=0,029$)¹⁰¹.

Caratteristiche cliniche del melanoma maligno

L'aspetto clinico del melanoma è estremamente polimorfo in relazione alla sua fase di sviluppo e in parte al suo istotipo. Tuttavia, può essere distinto in alcune entità cliniche:

- a) Il *melanoma piano a diffusione superficiale* che appare come una lesione maculare di forma più o meno asimmetrica e bordi irregolari con pigmentazione variabile dal roseo al marrone nerastro. Corrisponde il più delle volte al melanoma in situ o al melanoma inizialmente invasivo. Talora può essere difficile da differenziare dal nevo di Clark ⁷⁸.
- b) Il *melanoma cupoliforme* appare come una papula o un nodulo, di forma regolare emisferica, a superficie liscia, di colorito bruno-nerastro o nero-bluastro, di consistenza carnosa, spesso eroso e sanguinante, ricoperto da squamo-croste ematiche. I confini con la cute sana circostante sono sempre netti. Tuttavia, in alcuni casi la pigmentazione può mancare del tutto e configurare il quadro del melanoma amelanotico. Rappresenta la forma di melanoma più aggressiva dal momento che ha una crescita di tipo invasivo sin dall'inizio ⁷⁸.
- c) La *lentigo maligna o melanosì di Dubreuilh-Hutchinson* interessa soprattutto il volto di persone anziane ed appare come una macchia piana che si estende con estrema lentezza in superficie prima di acquisire caratteristiche d'invasività ⁷⁸.
- d) Il *melanoma lentiginoso acrale* interessa le regioni palmoplantari ed appare come una lesione maculare di colorito bruno chiaro, a

limiti sfumati che solo dopo molto tempo può iniziare la fase di crescita verticale ⁷⁸.

Caratteristiche dermatoscopiche del melanoma maligno

Sono state individuate diverse caratteristiche dermatoscopiche melanoma-specifiche; mentre per i melanomi con indice di Breslow <0.75 mm si possono distinguere diversi criteri dermatoscopici in relazione alla sede d'insorgenza, invece, per i melanomi spessi, l'espressione di tali criteri risulta indipendente dalla sede anatomica a causa del completo sovvertimento sulle strutture anatomiche preesistenti. Dunque, nel tronco e negli arti criteri dermatoscopici di rilevanza diagnostica sono: il pattern polimorfo, la rete di pigmento atipica, i punti/globuli irregolari, le strie irregolari, la pigmentazione irregolare, le strutture di regressione, il velo blu biancastro ¹⁰². Nel volto si riscontra invece il pattern reticolare, la pseudorete di pigmento atipica (strutture anulari-granulari, pseudorete grigiastrea, strutture romboidali), la pigmentazione irregolare, i punti/globuli irregolari ¹⁰¹. Nelle sedi acroposte si può ritrovare il pattern a creste parallele, i punti/globuli irregolari, la pigmentazione irregolare, le strie irregolari, il velo blu-biancastro. Nei melanomi di spessore > 0.75 mm si ritrovano in ordine decrescente di frequenza: il velo blu biancastro, i punti/globuli irregolari, la pigmentazione irregolare, le strie irregolari, la rete di pigmento atipica, un pattern vascolare costituito da strutture vascolari di morfologia puntiforme, lineare-irregolare e/o forcina, le strutture di regressione e i globuli rossi ¹⁰³.

Difficoltà diagnostica del melanoma in fase precoce

Più il melanoma cresce più è facile la diagnosi e più risulta una lesione mortale. Quindi, uno degli obiettivi più cruciali da raggiungere è quello della diagnosi del melanoma in fase iniziale. Sebbene sia importante non misconoscere un early melanoma, allo stesso modo è essenziale non rimuovere nevi benigni in modo indiscriminato a causa dell'esito cicatriziale, del costo economico e degli associati rischi chirurgici. La differenziazione tra early melanoma e nevo benigno può rappresentare talora una sfida e molti fattori devono essere considerati nel decidere se una lesione deve essere escissa o meno. Questi fattori comprendono una storia di modificazione della lesione, le valenze ansiose del paziente, una storia personale o familiare positiva per melanoma, caratteristiche di atipia della lesione, quanto la lesione si discosta in dimensione dagli altri nei, ecc. La dermatoscopia permette una diagnosi differenziale più facile tra lesioni benigne e maligne. Talora però anche con la dermatoscopia il riconoscimento di lesioni maligne può essere difficile ¹⁰⁴. Ci sono due motivi di carattere maggiore per i quali la diagnosi di melanoma può risultare difficile. In primo luogo un early melanoma può non avere ancora sviluppato sufficienti caratteristiche per essere riconosciuto clinicamente. In secondo luogo una lesione che è borderline clinicamente può essere anche borderline istologicamente. Infatti non ci sono degli standard istologici che possono discernere in modo assoluto tra un nevo con atipia severa (ma benigno) e un early melanoma. A meno che non vi sia una chiara evidenza di diffusione metastatica, alcune diagnosi rimangono incerte. L'approccio clinico ad una lesione pigmentata è basato sull'ABCD; i melanomi di larga superficie sono relativamente facili da riconoscere mentre early melanoma possono essere di piccole dimensioni e possono non avere chiare caratteristiche di

atipia. La dermatoscopia può essere d'aiuto nell'identificazione di queste lesioni in stadio precoce dal momento che permette la visualizzazione di strutture non visibili ad occhio nudo. Alcune caratteristiche dermatoscopiche sono considerate particolarmente utili nell'identificazione del melanoma: i pseudopodi, le strie radiali, il velo grigio blu ¹⁰⁵. Inoltre, per identificare gli early melanoma è stato suggerito l'ABCD dermatoscopico che considera l'asimmetria della lesione, la qualità dei bordi, i colori e la presenza di diverse strutture dermatoscopiche. Tuttavia, un certo numero di tumori rimane ancora misconosciuto ¹⁰⁴.

SCOPO DELLO STUDIO

Nel nostro studio abbiamo valutato l'associazione tra il polimorfismo IVS6+62G>A nell'introne 6 del gene TP53 e del polimorfismo EGF 61*G>A e la presenza di nevi melanocitici multipli (>100). L'eventuale dimostrazione di tale associazione mediante questo studio pilota potrebbe rivelarsi utile per allargare in modo consistente la casistica clinica mediante studi multicentrici includendo nello studio sia pazienti con alto numero di nevi melanocitici che pazienti affetti da melanoma.

MATERIALI E METODI

Il nostro studio è stato disegnato come uno studio osservazionale analitico del tipo caso-controllo. Per lo studio del polimorfismo di p53 sono stati presi in considerazione 215 soggetti di età compresa tra 21 e 60 anni (98 casi e 117 controlli), e 255 soggetti per lo studio di EGF (128 casi e 127 controlli). I casi e i controlli sono stati selezionati in primo luogo dal punto di vista strettamente clinico in base al numero di nevi, valutato attraverso un accurato esame ispettivo. Il nostro studio ha previsto un notevole sforzo per la selezione dei pazienti: tutti i nevi di tutti i pazienti sono stati esaminati al dermatoscopio manuale secondo i criteri sopra elencati. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad ulteriore valutazione clinica e dermatoscopica dopo 12 mesi per escludere modificazioni del quadro cutaneo ed in particolare l'insorgenza di melanomi maligni. Ciò ha permesso di escludere inoltre altri tumori cutanei (e.g. carcinoma basocellulare pigmentato). I pazienti ad alto rischio sono stati sottoposti ad analisi videodermatoscopica di tutte le lesioni. Tutti i nevi con atipie cliniche e dermatoscopiche sono stati fotografati col dermatoscopio digitale in epiluminescenza e archiviati. Tali lesioni sono state fotografate nuovamente dopo 6 mesi e confrontate con le immagini precedenti per escludere lesioni rapidamente evolutive e quindi potenzialmente neoplastiche. Le lesioni il cui aspetto clinico e dermatoscopico è risultato sospetto sono state sottoposte ad escissione chirurgica ed esame istologico. Questi procedimenti hanno permesso di ottenere una popolazione di pazienti con più di 100 nevi melanocitici ma non affetti da melanoma maligno o altri tumori cutanei. Tra i casi sono stati inclusi soggetti con un numero elevato di nevi (maggiore di 100), tra i controlli soggetti con un basso numero di nevi (<10). Per l'esame dermatoscopico

delle lesioni ci siamo avvalsi di un dermatoscopio manuale Heine Delta 20 (Heine Optotechnik), mentre per l'archiviazione delle immagini dermatoscopiche nei casi indicati di un Fotofinder Dermoscope (FotoFinder Systems GmbH) (Figura 10).



Figura 10: Heine Delta 20 (a sx) e Fotofinder Dermoscope (a dx).

Dopo aver informato i pazienti circa l'obiettivo e i limiti dello studio e dopo aver ottenuto il consenso informato, è stato prelevato un campione di sangue periferico da ciascuno di essi. Il materiale genetico di casi e controlli è stato estratto da 350 μ L di sangue periferico trattato con EDTA utilizzando l'Easy-DNA Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Successivamente, il polimorfismo di TP53 localizzato all'introne 6 (IVS6+62G>A) è stato genotipizzato tramite PCR ed High Resolution Melt

Analysis (HRMA). I primer sono stati selezionati utilizzando il software Open Source Primer 3 (<http://primer3.sourceforge.net/webif.php>).

I cicli della reazione a catena della polimerasi (PCR) e l'analisi HMR sono stati eseguiti in successione per mezzo del Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences, Concorde, NSW, Australia) usando TaKaRa Ex Taq R-PCR Custom (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan) (figura 11).



Figura 11: Rotor-Gene 6000.

La PCR è stata eseguita in un volume totale di 25 μL contenente 1X PCR buffer, 3 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTPs, 300 nM di primer, 1X EvaGreen, 1.5 U TaKaRa Ex Taq, e $3 \cdot 10^9$ copie/ μL DNA. L'analisi HRM è stata eseguita con temperature crescente (da 70° a 90°C, con intervalli di 0.1°C) e le impostazioni per l'acquisizione della fluorescenza raccomandate dal produttore. Le curve di HRM sono state normalizzate valutando i dati ricavati dai punti all'interno della regione per l'inizio e la fine della curva di Melt, usando il software fornito con Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences). Nell'analisi HRM abbiamo usato le curve degli omozigoti ed eterozigoti, che sono state confermate dal sequenziamento, come riferimento per l'analisi del genotipo dei campioni sconosciuti.

L'HRMA costituisce un metodo innovativo per lo studio dei polimorfismi genetici. Permette di distinguere gli amplificati sfruttando la diversa temperatura di denaturazione delle sequenze e può essere usata per rilevare tutti i tipi di variazioni di sequenza, dai singoli SNPs alle piccole inserzioni o delezioni. La denaturazione del DNA, detta anche DNA melting, è il processo per cui l'acido desossiribonucleico a doppio filamento (dsDNA double-stranded DNA) si svolge e si separa in due filamenti singoli (ssDNA single-stranded DNA). Prima dell'analisi HRM, la sequenza target deve essere amplificata in presenza di un fluoroforo che si lega al DNA a doppia elica ed emette fluorescenza se esposto a fonte luminosa di opportuna lunghezza d'onda (nel nostro caso è stato utilizzato EvaGreen che se eccitato ad una lunghezza d'onda di 470 nm, emette fluorescenza a 510 nm). Durante la reazione di amplificazione la concentrazione di DNA e quindi la fluorescenza aumentano in maniera esponenziale per poi arrivare rapidamente a plateau intorno al 35°-40° ciclo. Dopo l'amplificazione, i campioni subiscono una denaturazione progressiva da 70° a 90° C e la variazione dell'energia di fluorescenza viene monitorata per generare una curva di melting. La fluorescenza diminuirà con l'aumentare della temperatura mano a mano che il fluoroforo è rilasciato dal dsDNA che si dissocia in ssDNA. La temperatura in corrispondenza della quale si ha un repentino decremento della fluorescenza costituisce la temperatura di melting alla quale il 50% del DNA si trova in forma denaturata. Ad ogni prodotto di PCR corrisponde una temperatura di melting caratteristica, perciò tramite questo tipo di analisi è possibile distinguere i diversi genotipi come rappresentata nella figura 12.

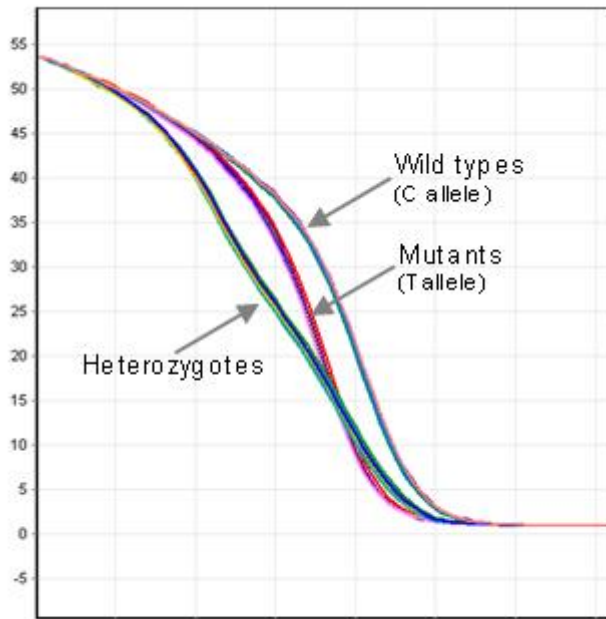


Figura 12: Figura rappresentativa dell'HRMA

Il laboratorio di riferimento per la genotipizzazione è stato il laboratorio di Genetica Molecolare presso l'Unità Operativa Complessa di Genetica Clinica ed Epidemiologica del Dipartimento di Pediatria dell'Università di Padova (responsabile: Prof. Maurizio Clementi).

Analisi statistica

La distribuzione dei genotipi nei casi e nei controlli è stata testata per la legge di Hardy-Weinberg. Le differenze nelle frequenze dei genotipi tra i due gruppi sono state testate per mezzo di test Chi-Quadrato per dati indipendenti. E' stato considerato statisticamente significativo un valore di $p \leq 0,05$.

RISULTATI

Sulla base di quanto dimostrato dalle curve di melting mediante HRMA sono state stabilite le frequenze assolute degli alleli e dei genotipi osservate nei casi e nei controlli in relazione al polimorfismo IVS6+62G>A del gene TP53 (tabella 2).

Dalla tabella si evince che il polimorfismo in questione è maggiormente rappresentato nei casi rispetto ai controlli: sia la frequenza del genotipo che la frequenza allelica risultano essere aumentate in modo statisticamente significativo nei pazienti con più di 100 nevi melanocitici.

Più in dettaglio si ha che il genotipo omozigote per il polimorfismo (A/A) è presente nei casi con una frequenza pari al 4,2% contro una frequenza dell' 1,9% nei controlli. Anche la frequenza del genotipo eterozigote G/A risulta essere significativamente incrementata nei casi rispetto al gruppo di controllo (32,5% nei casi; 23,6% nei controlli). Risultati analoghi tra casi e controlli si riscontrano anche per quanto riguarda le frequenze alleliche: mentre l'allele G è maggiormente rappresentato nella popolazione dei controlli (86,3% nei controlli e 79,6% nei casi), l'allele A prevale tra i pazienti con più di 100 nevi (20,4% nei casi e 13,7% nei controlli)

Polimorfismo	Ratio counts (Frequenza)		Chi-quadrato	Valore di p ($p \leq 0,05$)
	Casi	Controlli		
IVS6+62G>A				
Allele				
G	156 (79,6%)	202 (86,3%)	7,527	0,006
A	40 (20,4%)	32 (13,7%)		
IVS6+62G>A				
Genotipo				
G/G	62 (63,3%)	86 (74,5%)	7,623	0,022
G/A	32 (32,5%)	30 (23,6%)		
A/A	4 (4,2%)	1 (1,9%)		

Tabella 2. frequenze assolute, degli alleli e dei genotipi osservate nei casi e nei controlli.

Risulta pertanto evidente che sia la frequenza allelica (figura 12) che quella genotipica (figura 13) sono aumentate in modo statisticamente significativo nei pazienti con più di 100 nevi rispetto ai controlli con meno di 10 nevi.

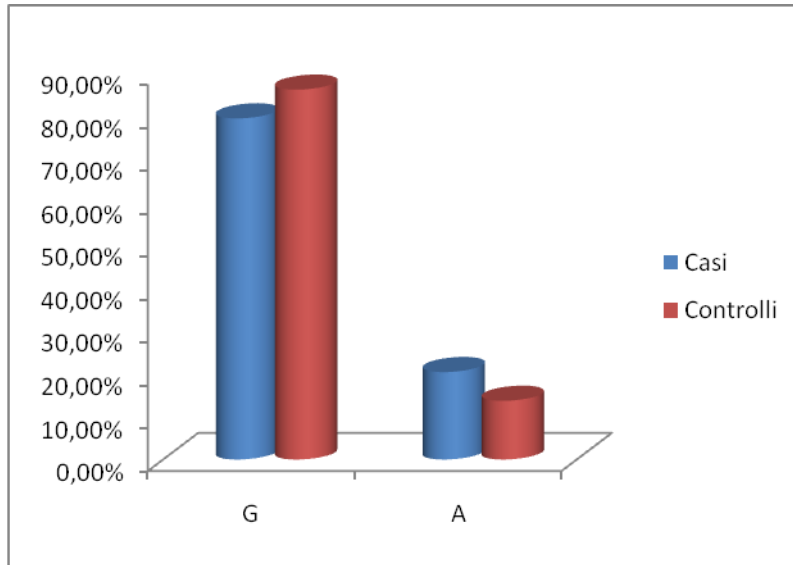


Figura 12: rappresentazione grafica delle frequenze alleliche in casi e controlli del polimorfismo IVS6+62G>A.

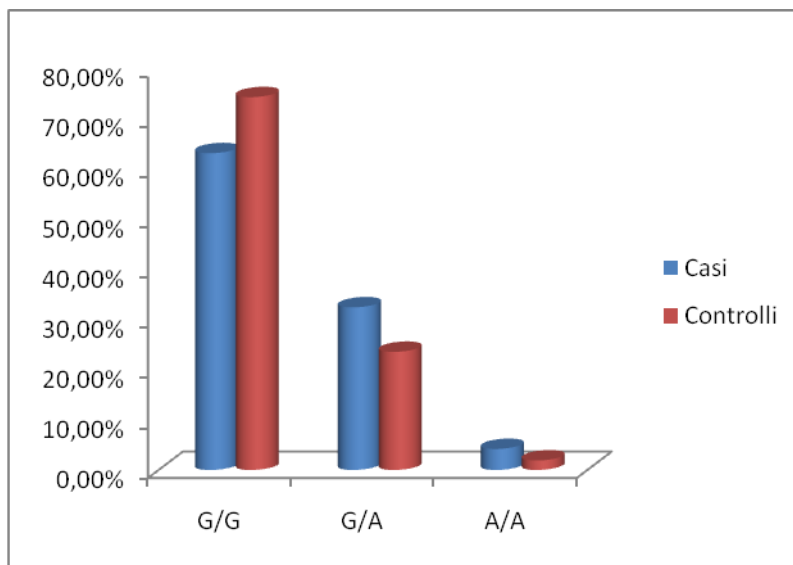


Figura 13: rappresentazione grafica delle frequenze genotipiche in casi e controlli del polimorfismo rs 1625895.

Per quanto riguarda EGF, L'analisi del polimorfismo 61 del gene EGF ha prodotto i risultati riportati nella tabella 3.

Polimorfismo	Ratio counts (Frequenza)			
	Casi	Controlli		
EGF 61*G>A				
Allele				
G	105 (41%)	102 (40%)		
A	151 (59%)	152 (60%)		
EGF 61*G>A				
Genotipo				
G/G	22 (17%)	23 (18%)		
G/A	61 (48%)	56 (44%)		
A/A	45 (35%)	48 (38%)		

Tabella 3: distribuzione della frequenza allelica nel totale dei pazienti e controlli presi in esame. Risulta evidente ad una semplice osservazione dei dati l'assenza di differenze tra le due popolazioni in esame, per ognuno dei parametri indagati.

DISCUSSIONE

I ruoli della proteina p53 in numerosi processi cellulari come ad esempio la trascrizione, la riparazione del DNA, il controllo del ciclo cellulare e l'induzione dell'apoptosi, ne fanno un potenziale marker per l'identificazione di pazienti con più alto rischio di sviluppare cancro ¹⁰⁶. Il melanoma può insorgere da nevi preesistenti ed è pertanto plausibile che l'arresto del ciclo cellulare dei melanociti normali possa essere impedito da alterazioni di geni coinvolti in tale meccanismo regolatorio. In particolare, è stato dimostrato che alterazioni nella funzionalità della p53 sono responsabili dell'aumentata proliferazione dei melanociti. Infatti la distruzione della p53 determina l'immortalizzazione dei melanociti normali e ne promuove una rapida trasformazione in senso neoplastico con presenza di instabilità genetica e proliferazione incontrollata ¹⁰⁷. Questi dati sono quindi coerenti con l'ipotesi che la proteina p53 svolga un ruolo di oncosoppressore in relazione alla trasformazione neoplastica delle cellule melanocitarie presenti nei nevi melanocitici. Un'ulteriore conferma a tale ipotesi è la dimostrazione che nel passaggio da nevi melanocitici a melanoma vi sono alterazioni nell'espressione di geni sottoposti alla regolazione di p53 ¹⁰⁷.

P53 è in grado di influenzare l'attività dei melanociti in diversi modi. Un'analisi di Box e Terzian del 2008 ha sottolineato come tale proteina svolga un ruolo fondamentale nella trascrizione dei geni deputati alla produzione di citochine coinvolte nella regolazione dei melanociti. In particolare l'azione di questi fattori paracrini (KITLG, EDN1, FGF2, α -MSH/ACTH) sembra essere indirizzata alla proliferazione e al processo di melanogenesi proprio di queste cellule. Le conclusioni di tale studio suggeriscono che queste citochine possano giocare un

ruolo nel processo di insorgenza del melanoma; a riprova di ciò si è notato che la progressione di tale patologia è dipendente dall'espressione autocrina degli stessi fattori di crescita la cui produzione è controllata da p53¹⁰⁸.

Anche per quanto concerne il processo di pigmentazione cutanea è ormai noto il ruolo cruciale svolto da p53. È stato dimostrato che i promotori dei principali geni che codificano per gli enzimi implicati in tale processo, ovvero tirosinasi e tirosinasi-related protein-1 (TRP-1), sono attivati da p53 "wild-type"¹⁰⁹. Sempre per quanto riguarda l'azione di p53 nel processo di iperpigmentazione un recente studio di Cui et al. ha dimostrato la capacità di tale proteina di incrementare la trascrizione di geni codificanti per citochine melanogeniche come la proopiomelanocortina (POMC) nei cheratinociti. La presenza di una specifica sequenza consenso (necessaria affinché p53 leghi il DNA) è stata infatti rilevata a livello del promotore del gene codificante per POMC. Sempre in tale studio è stato osservato che in seguito all'esposizione di topi ai raggi UV si assiste ad un'attivazione di p53 che a sua volta determina la trascrizione di POMC a livello dei cheratinociti portando alla produzione di una sostanza, derivata dalla POMC, dotata di attività melanocitostimolante: l' α -MSH (melanocyte stimulating hormone)¹¹⁰. Noonan e De Fabo hanno indagato l'azione di p53 nei melanociti in relazione al processo apoptotico conseguente all'esposizione ai raggi UVB-UVA. Le loro conclusioni evidenziano una duplice modalità di induzione di morte cellulare programmata p53 dipendente: in seguito all'esposizione agli UVA si assiste al rilascio del citocromo c mitocondriale, in seguito all'esposizione agli UVB si osserva, invece, un processo di permeabilizzazione lisosomiale con rilascio di catepsina¹¹¹. p53 è in grado di regolare il processo apoptotico dei melanociti anche attraverso la regolazione della trascrizione della proteina

survivina. Quest'ultima è un inibitore dell'apoptosi che riveste un ruolo di mediatore sia per quanto riguarda la resistenza all'apoptosi che nella progressione del ciclo cellulare; è espressa nel melanoma a livelli molto più alti rispetto alle cellule sane. Nel melanocita normale p53 lega direttamente il promotore della survivina mantenendone bassa l'espressione; in seguito ad alterazioni della p53 si assiste ad un aumento della trascrizione di tale proteina con conseguente inibizione dell'apoptosi^{112, 113}.

p53 svolge un ruolo centrale anche nel sistema SOS di correzione dei danni indotti dai raggi UV sul DNA dei melanociti. In caso di danno al DNA p53 viene accumulata e attivata dalla proteina thymidine dinucleotide (pTpT) (quest'ultima svolge anche un ruolo cruciale nel processo di melanogenesi). Una volta attivata p53 agisce a sua volta da attivatore trascrizionale dei geni GADD45 e SDI1 implicati direttamente nel processo di riparazione del DNA¹¹⁴. Dai dati succitati e' pertanto evidente come alterazioni genetiche di p53 anche fenotipicamente minori come quelle osservabili nei polimorfismi genetici da noi analizzati potrebbero essere implicate nel predisporre l'individuo all'evento neoplastico pur non avendo la rilevanza clinica che si osserva nel caso delle mutazioni vere e proprie. Questo fenomeno assume particolare rilevanza nella cute dato il ruolo fondamentale della p53 nel processo di riparazione del DNA dopo l'esposizione alle radiazioni ultraviolette, considerando anche il fatto che l'interazione gene-ambiente ha un comprovato ruolo nella genesi delle neoplasie cutanee.

Considerando dunque la stretta correlazione esistente tra la presenza di polimorfismi nel gene TP53, la loro proprietà di cancerogenesi¹¹⁵ (come detto precedentemente è probabile, infatti, che la presenza di polimorfismi genici possa alterare la stabilità della proteina p53 e influenzarne le capacità funzionali quali,

ad esempio, la possibilità di riparare il DNA danneggiato, la capacità di legare le sequenze specifiche del DNA dei geni target, la capacità di interagire con altre proteine) e l'importanza di p53 nella regolazione dei melanociti, abbiamo deciso di analizzare il polimorfismo IVS6+62G>A in pazienti con numero di nevi melanocitici elevato (>100). I nostri dati preliminari sono estremamente incoraggianti dal momento che dimostrano un'associazione statisticamente significativa tra il suddetto polimorfismo e la presenza di un alto numero di nevi melanocitici. E' plausibile che alterazioni dell'espressione della p53, sia pur minime come quelle osservabili nei polimorfismi genetici che coinvolgono regioni regolatorie del DNA, possano essere responsabili di un alterato controllo della proliferazione melanocitaria che si traduce clinicamente in un alto numero di nevi melanocitici.

Anche il ruolo di EGF nello stimolo della mitogenesi e della proliferazione cellulare è comprovato e studi recenti hanno sottolineato il suo effetto specifico sulle cellule melanocitarie e nella promozione dello sviluppo del melanoma maligno. Il polimorfismo di EGF che ha destato maggiore attenzione degli studiosi in questo ambito è stato descritto da Shabhazi et al. ⁵⁰, i quali hanno individuato una sostituzione di singolo nucleotide (G to A) in posizione 61 del gene EGF. Le cellule degli individui omozigoti per l'allele A producono significativamente meno EGF delle cellule degli individui omozigoti per l'allele G/G o degli individui eterozigoti (A/G). Il genotipo G/G si è dimostrato significativamente associato ad aumentato rischio di melanoma maligno e ad aumentato spessore di Breslow. Questi dati suggeriscono che la produzione di EGF può essere determinante nello sviluppo del melanoma maligno. Il ruolo di EGF nella patogenesi del melanoma è stato preso in esame McCarron et Al. ⁵⁵ nel

2003 in uno studio nel quale non sono risultate evidenti differenze significative nel genotipo EGF tra i pazienti affetti da melanoma e i controlli sani. In questo lavoro è stata dimostrata una correlazione debole tra aumentata produzione di EGF (genotipo G/G) e spessore di Breslow maggiore di 3,5 mm (30.0% vs. 9.8%, $p = 0.03$). Nel 2004 Amend et Al.⁵⁶ hanno pubblicato un lavoro nel quale non è risultata un'associazione significativa tra sviluppo di melanoma o aumentato spessore di breslow e allele 61*G o omozigosi G/G per il gene EGF. James et Al.⁵⁷ nel 2004 hanno dimostrato che i soggetti omozigoti per l'allele G hanno tumori più spessi ($p=0,05$) ma non esiste una correlazione tra il polimorfismo dell'EGF e lo sviluppo di melanoma, così come di nevi o di efelidi. Randerson-Moor et Al.⁵⁸ al contrario hanno evidenziato una correlazione tra la variante allelica A/A e diminuito spessore di Breslow (Odds Ratio 0.5, 95% CI 0.3-0.9) mentre nel loro studio non è risultata alcuna correlazione tra genotipo EGF e sviluppo di melanoma maligno o numero totale di nevi melanocitici. Complessivamente solo due lavori (James et Al.⁵⁷, Randerson-Moor et Al.⁵⁸) hanno messo in relazione il genotipo per EGF e il numero totale di nevi melanocitici. Entrambi questi lavori non hanno trovato alcuna relazione tra questi due parametri.

Il nostro lavoro ha cercato di correlare il genotipo EGF con la presenza di più di 100 nevi melanocitici di dimensioni superiori ai 3 millimetri¹¹⁶. L'ipotesi che i nevi melanocitici atipici costituissero un possibile fattore di rischio per il melanoma maligno fu posta per la prima volta nel 1978 con la descrizione della cosiddetta B-K mole sindrome, da parte di Clark e colleghi¹¹⁷. Il termine B-K mole sindrome deriva dalle iniziali di due giovani pazienti coinvolti nello studio¹¹⁸. Nello stesso anno Lynch e colleghi¹¹⁹ hanno descritto una sindrome di melanoma familiare nel contesto di numerosi nevi atipici di grandi dimensioni.

Queste caratteristiche cliniche sono riconducibili alla cosiddetta *Dysplastic Nevus Syndrome* (sindrome del nevo displastico), descritta per la prima volta nel 1980 da Elder et Al.¹²⁰, associata al melanoma sporadico (non familiare). Questi studi hanno stimolato l'interesse della comunità scientifica nell'analisi dei fattori di rischio epidemiologici per il melanoma. Sono stati in seguito condotti studi limitati alle lesioni sulle braccia^{121, 122, 123, 124}. Poi sono state prese in esame tutte le lesioni sulla superficie corporea^{125, 126, 127} e tutti i tipi di lesione pigmentate cutanee¹²⁸. Numerosi studi hanno dimostrato che il numero totale di nevi melanocitici è il fattore di rischio più determinante nello sviluppo del melanoma maligno^{129, 130, 131, 132, 133}. All'osservazione epidemiologica si affianca anche l'evidenza istologica del fatto che nel 20-60% dei melanomi maligni sono presenti residui di lesione nevica^{134, 135}. Questa osservazione porta a considerare i nevi melanocitici come un potenziale importante step nello sviluppo del melanoma maligno^{136, 137, 138}. E' stata studiata inoltre la correlazione tra tipo di melanoma e importanza o meno del numero di nevi melanocitici come fattore di rischio. E' stato osservato¹³⁹ che i nevi melanocitici costituiscono un forte fattore di rischio per il melanoma a diffusione superficiale, mentre la lentigo maligna-melanoma è correlata principalmente al fototipo e al colore dei capelli. Un altro importante campo di ricerca in questo settore è lo studio dei fattori di rischio per lo sviluppo di numerosi nevi melanocitici. Il principale fattore di rischio ambientale è risultato essere la fotoesposizione^{140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147}. I bambini sviluppano nevi melanocitici rapidamente in proporzione alla quantità e all'intensità dell'esposizione solare^{148, 149, 150, 151, 152}. Ulteriori studi nei bambini hanno evidenziato l'importanza delle caratteristiche legate alla pigmentazione come cute

di colore chiaro, capelli rossi, lentiggini, occhi blu, efelidi e tendenza alle scottature solari nel determinare lo sviluppo di nevi melanocitici ^{153, 154, 155, 156}.

Studi su gemelli e su famiglie affette da melanoma hanno concluso che vi è una base ereditaria molto forte per il numero totale di nevi melanocitici e per la densità di tali lesioni ^{157, 158, 159, 160, 161, 162}. La semplice esposizione solare dovuta alle attività estive all'aperto è sufficiente allo sviluppo di nevi melanocitici nei bambini, anche in assenza di scottature ^{163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172}. In conclusione è evidente che il numero di nevi melanocitici è il più forte fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di melanoma cutaneo, seguito dal numero di nevi melanocitici atipici e dalle lentiggini attiniche. Il rischio di trasformazione maligna di un singolo nevo melanocitico nel corso dell'intera vita può essere stimata attorno ad una probabilità su 2000. Tenendo conto del fatto che solo i nevi melanocitici atipici si trasformano in melanoma maligno, il rischio di trasformazione di un nevo melanocitico atipico può essere stimata a 1 su 60. Il ruolo dell'esposizione solare è duplice: è stato dimostrato che la fotoesposizione moderata costituisce un fattore di rischio per lo sviluppo di numerosi nevi melanocitici mentre le scottature solari e la fotoesposizione intermittente ma intensa correlano con aumentato rischio di sviluppare il melanoma maligno.

La sorveglianza dei pazienti ad alto rischio per lo sviluppo del melanoma maligno si è dimostrata efficace nella diagnosi precoce di tale neoplasia ¹⁷³. Al contrario lo screening della popolazione generale non si è rivelato efficace nel ridurre la mortalità del melanoma ¹⁷⁴. Nel nostro studio abbiamo cercato di individuare uno strumento per discriminare mediante un semplice prelievo di sangue una popolazione a rischio per lo sviluppo del melanoma maligno da sottoporre a visite dermatologiche accurate a scadenza ravvicinata. I risultati tuttavia non hanno

mostrato una correlazione statisticamente significativa tra il genotipo per EGF e un numero di nevi melanocitici superiore a 100. Il nostro risultato è dunque consistente con il lavoro di Randerson-Moor et Al.⁵⁸ e col lavoro di James et Al.⁵⁷. Entrambi gli autori hanno messo in relazione il genotipo per EGF e il numero totale di nevi, senza trovare alcun risultato statisticamente significativo. Ulteriori studi saranno dunque necessari per chiarire il ruolo del polimorfismo del gene dell'Epidermal Growth Factor nel numero totale di lesioni pigmentate, nella patogenesi e nella prognosi del melanoma maligno.

CONCLUSIONI

Dai risultati di questo studio emerge che la presenza del polimorfismo IVS6+62G>A nel gene TP53 sembra essere correlata con un alto numero di nevi melanocitici presenti a livello cutaneo. La frequenza del SNP a livello del suddetto gene risulta essere significativamente incrementata nei casi rispetto al gruppo di controllo. Tale studio pilota potrebbe rappresentare un importante dato di partenza per analisi multicentriche coinvolgenti un più alto numero di pazienti con nevi melanocitici multipli ed in seguito anche pazienti affetti da melanoma. L'importanza di TP53 nell'indurre la proliferazione melanocitaria ed i nostri dati sul suddetto polimorfismo suggeriscono inoltre di approfondire lo studio di altri polimorfismi genetici osservati nel gene in questione e la loro associazione con i disordini melanocitari. E' plausibile che alterazioni dell'espressione della p53, sia pur minime come quelle osservabili nei polimorfismi genetici che coinvolgono regioni regolatorie del DNA, possano essere responsabili di un alterato controllo della proliferazione melanocitaria che si traduce clinicamente in un alto numero di nevi melanocitici. I risultati invece non hanno mostrato una correlazione statisticamente significativa tra il genotipo per EGF e un numero di nevi melanocitici superiore a 100. Ulteriori studi con un maggior numero di pazienti potrebbero saranno necessari per meglio chiarire il ruolo del polimorfismo di EGF in esame nello sviluppo di numerosi nevi melanocitici.

BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Griffiths A, Gelbart W, Lewontin R, Suzuki D, Miller J, Wessler S. *Genetica: Principi di analisi formale*. Ed. Zanichelli 2006.
- ² Lewin B: *Il gene VIII*. Ed. Zanichelli 2006.
- ³ Novelli G, Giardina E: *Genetica medica pratica*. Ed. Aracne 2004.
- ⁴ Lane D, Benchimol S: P53: oncogene or anti-oncogene? *Gene & Development* 1990; 4: 1-8.
- ⁵ Levine A, Momand J, Finlay C: The p53 tumor suppressor gene. *Natur*, 1991; 351: 453-456.
- ⁶ Kastan M: P53: evolutionally conserved and constantly evolving. *Journal of NIH Research* 1993; 5: 53-57.
- ⁷ Stephens T. Closing in on p53's normal function. *Journal of NIH Research* 1991; 3: 32-36.
- ⁸ Vogelstein B, Kinzler K. P53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70: 523-526.
- ⁹ Lane D: P53, guardian of genome. *Nature* 1992; 358: 15-16.
- ¹⁰ Parada, L. F., H. Land, R. A. Weinberg, D. Wolf, and V. Rotter. 1984. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature (London)* 312:649-651
- ¹¹ Hinds P, Finlay C, Levine AJ Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol*. 1989 Feb;63(2):739-46

-
- ¹² Bode AM, Dong ZG: Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 4 2004;10: 793-805
- ¹³ Chen J, Lin J, Levine AJ: Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene. *Mol. Med* 1 1995; 142-152.
- ¹⁴ Zhao K, Chai X, Johnston K, Clements A, Marmorstein R: Crystal structure of the mouse p53 core DNA-binding domain at 2.7Å resolution. *J. Biol. Chem.* 276 2001; 15: 12120–12127.
- ¹⁵ Pavletich NP, Chambers KA, Pabo CO. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev.* 1993 Dec;7(12B):2556-64
- ¹⁶ Ayed A, Mulder FA, Yi GS, Lu Y, Kay LE, Arrowsmith C H: Latent and active p53 are identical in conformation. *Nat. Struct. Biol.* 8 2001;9: 756–760.
- ¹⁷ Vogelstein B, Lane D, Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* 408 2000;6810: 307–310.
- ¹⁸ El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B: Definition of a consensus binding site for p53, *Nat. Genet.* 1 1992;1: 45–49.
- ¹⁹ Bourdon JC, Deguin-Chambon V, Lelong JC, Dessen P, May P, Debuire B, May E: Further characterisation of the p53 responsive element-identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene* 14 1997;1: 85–94
- ²⁰ Michael D, Oren M: The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin. Cancer Biol.* 13 2003;1: 49–58.

-
- ²¹ Tan ZQ, Tu WL, Schreiber SS: Downregulation of free ubiquitin: a novel mechanism of p53 stabilization and neuronal cell death, *Mol. Brain Res.* 2001;91: 179–188.
- ²² Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Biologia molecolare della cellula*. Ed. Zanichelli 2004
- ²³ Kun-Xian Shu, Biao Li, Li-Xiang Wu: The p53 network: p53 downstream genes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2007;55: 10-18.
- ²⁴ Farnebo M, Bykov VJN, Wiman KG: The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010;396: 85-89.
- ²⁵ Bensaad K, Tsuruta A, Selak M A, Vidal M N, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden K H: TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 2006;126: 107-120.
- ²⁶ Nunobiki O, Ueda M, Yamamoto M, Toji E, Sato N, Izuma S, Okamoto Y, Torii K, Noda S: Polymorphism of p53 codon 72 and MDM2 promoter 309 and the risk of endometrial cancer. *Human Cell* 2009; 22: 101-106.
- ²⁷ Ueda M, Hung YC, Terai Y: Glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and p53 codon 72 polymorphisms in human tumor cells. *Hum Cell* 2003; 16: 241–51.
- ²⁸ Ueda M, Toji E, Nunobiki O: Germline polymorphism of cancer susceptibility genes in gynecologic cancer. *Hum Cell* 2008; 21: 95–104.
- ²⁹ Litviakov NV, Denisov EV, Takhauov RM, Karpov AB, Skobel'skaja EV, Vasil'eva EO, Goncharik OO, Ageeva AM, Mamonova NV, Mezheritskiy SA, Sevost'janova NV, Koshel AP: Association Between TP53 Gene

ARG72PRO Polymorphism and Chromosome Aberrations in Human cancer Molecular carcinogenesis 2010; 49:521–524.

³⁰ Grochola LF, Zeron-Medina J, Meriaux S, Bond GL: Single-nucleotide Polymorphisms in the p53 Signaling Pathway. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010; 2(5):a001032.

³¹ Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, George DL, Murphy M. 2003: The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. Nat Gen 2003;33(3):357-65.

³² Wang W, Spitz MR, Yang H, Lu C, Stewart DJ, Wu X. Genetic variants in cell cycle control pathway confer susceptibility to lung cancer. Clin Cancer Res. 2007 Oct 1;13(19):5974-81.

³³ Normanno N, Bianco C, De Luca A, Salomon DS. The role of EGF-related peptides in tumor growth. Front Biosci 2001;6:D685–707.

³⁴ Laurence DJ, Gusterson BA. The epidermal growth factor. A review of structural and functional relationships in the normal organism and in cancer cells. Tumor Biol 1990.

³⁵ Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. J Biol Chem 1990;265:7709–12.

³⁶ Lazar-Molnar E, Hegyesi H, Toth S, Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. Cytokine 2000;12:547–54.

³⁷ Harris RC, Chung E, and Coffey RJ. (2003). EGF receptor ligands. Exp. Cell. Res. 284 (1): 2–13.

³⁸ Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. Exp Cell Res. 2003 Mar 10;284(1):2-13

³⁹ Epidermal growth factor, its receptor, and related proteins. Carpenter G, Zenguei JG. Exp Cell Res. 1986 May;164(1):1-10.

⁴⁰ Honegger AM, Kris RM, Ullrich A, Schlessinger J. Evidence that autophosphorylation of solubilized receptors for epidermal growth factor is mediated by intermolecular cross-phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (1989) 925-929.

⁴¹ Yu X, Sharma KD, Takahashi T, Iwamoto R, Mekada E. Ligand independent dimer formation of epidermal growth factor receptor (EGFR) is a step separable from ligand-induced EGFR signalling. *Mol Biol Cell* 13 (2002) 2547-2557.

⁴² Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW et al. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling. *Exp Cell Res* 2003; 284 31-53

⁴³ Smith JM, Sporn MB, Roberts AB, Derynck R, Winkler ME, Gregory H. Human transforming growth factor- α causes precocious eyelid opening in newborn mice. *Nature* 315 (1985) 515-516

⁴⁴ Topham RT, Chiego DJJ, Gattone VH, Hinton DA, Klein RM. The effect of epidermal growth factor on neonatal incisor differentiation in the mouse. *Dev Biol* 124 (1987) 532-543.)

⁴⁵ Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. EGF mutant receptor VIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 8 (2001) 83-96.

⁴⁶ Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW et al. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling. *Exp Cell Res* 2003; 284 31-53

⁴⁷ M Worm, A Makki, E Dippel, BM Czarnetzki and D Schadendorf, Interferon-gamma down regulates epidermal growth factor receptors on human melanoma cells, *Exp Dermatol* **4** (1995), p. 305.

⁴⁸ Hehir DJ, McGreal G, Kirwan WO, Kealy W, Brady MP. c-myc oncogene expression: a marker for females at risk of breast carcinoma. *J Surg Oncol* 54 (1993) 207-209.

⁴⁹ Wells A. Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility. *Adv Cancer Res* 78 (2000) 31-101.

⁵⁰ Shahbazi M, Pravica V, Nasreen N, et al. Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. *Lancet* 2002;359:397-401.

⁵¹ E Lazar-Molnar, H Hegyesi, S Toth and A Falus, Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma, *Cytokine* 12 (2000), pp. 547-554.

⁵² U Rodeck and M Herlyn, Characteristics of cultured human melanocytes from different stages of tumor progression, *Cancer Treat Res* 43 (1988), pp. 3-16

⁵³ U Rodeck, Growth factor independence and growth regulatory pathways in human melanoma development, *Cancer Metastasis Rev* 12 (1993), pp. 219-226

⁵⁴ D Ma and JY Niederkorn, Role of epidermal growth factor receptor in the metastasis of intraocular melanomas, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 (1998), pp. 1067-1075

⁵⁵ McCarron SL, Bateman AC, Theaker JM, Howell WM. EGF +61 gene polymorphism and susceptibility to and prognostic markers in cutaneous malignant melanoma. *Int J Cancer*, 107: 673-5, 2003

⁵⁶ Amend et Al. EGF gene polymorphism and the risk of incident primary melanoma, *Cancer Res.* 2004 Apr 15;64(8):2668-72

⁵⁷ James MR, Hayward NK, Dumenil T, Montgomery GW, Martin NG, Duffy DL. Epidermal growth factor gene (EGF) polymorphism and risk of melanocytic neoplasia. *J Invest Dermatol.* 2004 Oct;123(4):760-2.

⁵⁸ Randerson-Moor JA, Gaut R, Turner F, Whitaker L, Barrett JH, Silva Idos S, Swerdlow A, Bishop DT, Bishop JA. The relationship between the epidermal growth factor (EGF) 5'UTR variant A61G and melanoma/nevus susceptibility. *J Invest Dermatol.* 2004 Oct;123(4):755-9.

⁵⁹ Argenziano G. , Soyer H.Peter, De Giorni V., Piccolo D., Carli P., Delfino M, Ferrari A., Hofmann-Wellenhof R., Massi D., Mazzocchetti G., Scalvenzi M., Wolf H. Ingrid. *Atlante di dermoscopia*, Ed. EDRA Medical Publishing and New Media, 2000

⁶⁰ Bauer P, Cristofolini P, Boi S. Digital epiluminescence microscopy: usefulness in the differential diagnosis of cutaneous pigmented lesions. A statistical comparison between visual and computer inspection. *Melanoma Research* 2000,10, pp.345-349.

⁶¹ Binder M, Puspoeck-Schwarz, Steiner A. et al. Epiluminescence microscopy of small pigmented skin lesions: Short-term formal training improves the diagnostic performance of dermatologist. *J Am Acad Dermatol* 1997;36:197-202.

⁶² Argenziano G, Fabbrocini G, Carli P, De Giorgi V, Sammarco E, Delfino M. Epiluminescence microscopi for the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. Comparison of the ABCD rule of dermatoscopy and a new 7-point checklist based on pattern analysis. *Arch Dermatol* 1998; 134:1536-1570.

⁶³ Katz B, Rabinovitz SH. Introduction of dermoscopy. *Dermatologic clinics* 2001;19:.221-258.

⁶⁴ Saida T, Oguchi S, Ishihara Y. In vivo observation of magnified features of pigmented lesions on volar skin using video macroscope: Usefulness of

epiluminescence techniques in clinical diagnosis. *Arch Dermatol* 1995; 131: 298-304.

⁶⁵ Menzies SW, Crotty KA, McCarthy WH. The morphologic criteria of the pseudopod in surface microscopy. *Arch Dermatol* 1995; 131:436-440

⁶⁶ Pelleciani G., Cesinaro AM, Seidanari S. Morphological features of Spitz Naevus as observed by digital videomicroscopy. *Acta Derm Venereol* 2000; 80:117-121. Argenziano G, Scalvenzi

⁶⁷ Massi D, De Giorgi V, Soyer HP. Histopathologic correlates of dermoscopic criteria. *Dermatol clin* 2001; 19:259-268.

⁶⁸ Rao BK, Wang SQ, Murphy FP. Typical dermoscopic patterns of benign melanocytic nevi. *Dermatol clin* 2001;19:269-284.

⁶⁹ Argenziano G, Scalvenzi M, Staibano S, et al. Dermatoscopic pitfalls in differentiating pigmented Spitz naevi from cutaneous melanomas. *Br J Dermatol* 1999; 141:788-793.

⁷⁰ Soyer HP, Smolle J, Leitinger G. et al. Diagnostic reliability of dermoscopic criteria for detecting malignant melanoma. *Dermatology* 1995: 190:25-30

⁷¹ Soyer HP, Argenziano G, Chimenti S, Rocco V. Dermoscopy of pigmented skin lesions. *European Journal of Dermatology* 2001;11:270-7.

⁷² Bafounta ML, Beauchet A., Aegerter P. et al. Is dermoscopy (Epiluminescence Microscopy) useful for the diagnosis of melanoma?. *Arch Dermatol* 2001; 137:1343-1350.

⁷³ Binder M, Schwarz M, Winkler A. et al. Epiluminescence microscopy: a useful tool for the diagnosis of pigmented skin lesions for formally trained dermatologists. *Arch Dermatol.*1995; 131:286-291.

⁷⁴ Seidenari S, Pellacani G, Pepe P. Digital videomicroscopy improves diagnostic accuracy for melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1998;39:175-81.

⁷⁵ Ferrara G., Argenziano G, Soyer HP et al. Dermoscopic and Histopathologic diagnosis of equivocal melanocytic skin lesions. *Cancer* 2002; 95:1094-1100.

⁷⁶ Soyer HP, Smolle J, Kerl H. Surface microscopy : a new approach to the diagnosis of cutaneous pigmented tumors. *Am J Dermatopathol* 1989;11:1-10.

⁷⁷ Grichnik JM. Difficult early melanomas. *Dermatol clin* 2001;19:319-325.

⁷⁸ Cainelli T, Giannetti A, Rebora A : *Manuale di dermatologia medica e chirurgica.* Ed. McGraw-Hill 2000

⁷⁹ Steiner A., Pehamberger H., Binder M. et al. Pigmented Spitz nevi: improvement of the diagnostic accuracy by epiluminescence microscopy. *J Am Acad Dermatol* 1992;27:697-701.

⁸⁰ Barnhill RL, Albert LS, Shama SK. Genital lentiginosis: a clinical and histopathologic study. *J Am Acad Dermatol* 1990;22:453-460.

⁸¹ Markovic SN, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, Vachon CM, Schild SE, McWilliams R, Hand JL, Laman SD, Kottschade LA, Maples WJ, Pittelkow MR, Pulido JS, Cameron JD, Creagan ET: For the melanoma study group of the mayo clinic cancer center. *Meyo Clinic Proc.* 2007; 82(3):364-380.

⁸² Reed RJ. The histological variance of malignant melanoma: the interrelationship of histological subtype, neoplastic progression, and biological behaviour. *Pathology* 1985; 17: 301-312

⁸³ Herlyn M, Houghton AN. Biology of melanocytes and melanoma. In: Balch CM, Houghton AN, Milton GW, Sober AJ, Soong S, editors. *Cutaneous melanoma*. 2nd ed. Philadelphia: JB Lippincott Company. 1992

⁸⁴ Garbe C, Buttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Kruger S, et al. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 1994; 102:695-699

⁸⁵ Grob JJ, Gouvernet J, Aymar D, Mostaque A, Romano MH, Collet AM, et al. Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for nonfamilial nodular and superficial spreading melanoma. *Cancer* 1990; 66:387-395

⁸⁶ Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17:459-468.

⁸⁷ Bauer J, Garbe C. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res* 2003; 16:297-306

⁸⁸ Greene MH. The genetics of hereditary melanoma and nevi: 1998 Update. *Cancer* 1999; 86: 2464-2477

⁸⁹ Halachmi S, Gilchrest BA. Update on genetic events in the pathogenesis of melanoma. *Curr Opin Oncol* 2001; 13: 129-136

⁹⁰ NK Hayward, Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene* (2003) 22, 3053-3062

-
- ⁹¹ Hayward N. New developments in melanoma genetics. *Curr Oncol Rep.* 2000 Jul;2(4):300-6
- ⁹² Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *NC.Nat Genet.* 1996 Jan;12(1):97-9.
- ⁹³ M Ruas, G Peters, The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives, *Biochimica et Biophysica Acta* 1378 (1998) F115^F177
- ⁹⁴ Aitken J, Welch J, Duffy D, Milligan A, Green A, Martin N, Hayward N. CDKN2A variants in a population-based sample of Queensland families with melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Mar 3;91(5):446-52.
- ⁹⁵ Sauroja I et Al. Analysis of G(1)/S checkpoint regulators in metastatic melanoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000 Aug;28(4):404-14.
- ⁹⁶ Kennedy C, ter Huurne J, Berkhout J, Gruis N, Bastiaens M, Bergman W, Willemze R, Bavinck JN. Melanocortin 1 receptor (MCR1) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *J Invest Dermatol* 2001;117:294 -300.
- ⁹⁷ Rosalind M. et Al. Evidence for Variable Selective Pressures at MC1R, *Am J Hum Genet.* 2000 April; 66(4): 1351-1361.
- ⁹⁸ Lafuente A, Molina R, Palou J, Castel T, Moral A, Trias M. Phenotype of glutathione S-transferase Mu (GSTM1) and susceptibility to malignant melanoma. *Br J Cancer* 1995;72:324-6.
- ⁹⁹ Strange RC, Ellison T, Ichii-Jones F, Bath J, Hoban P, Lear JT, Smith AG, Hutchinson PE, Osborne J, Bowers B, Jones PW, Fryer AA. Cytochrome P450 CYP2D6 genotypes: association with hair colour,

Breslow thickness and melanocyte stimulating hormone receptor alleles in patients with malignant melanoma. *Pharmacogenetics* 1999; 9:269 – 76.

¹⁰⁰ Wolf CR, Smith CA, Gough AC, Moss JE, Vallis KA, Howard G, Carey FJ, Mills K, McNee W, Carmichael J and Spurr N. (1992). *Carcinogenesis*, 13, 1035–1038.

¹⁰¹ Hutchinson PE, Osborne JE, Lear JT, Smith AG, Bowers PW, Morris PN, Jones PW, York C, Strange RC, Fryer AA. Vitamin D receptor polymorphisms are associated with altered prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:498 –504.

¹⁰² Stanganelli I, Zago S, Testori A, et al. Epiluminescence microscopy features of melanoma in relation to tumor thickness: Current concepts and clinical examples. *Dermatol clin* 2001;19:285-296.

¹⁰³ Argenziano G., Fabbrocini G, Carli P, De Giorgi V, Delfino M. Clinical and dermoscopic criteria for the preoperative evaluation of cutaneous melanoma thickness. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40:61-68.

¹⁰⁴ Menzies SW, Ingvar C., McCarthy. A sensitivity and specificity analysis of the surface microscopy features of invasive melanoma. *Melanoma Research* 1996;6:55-62.

¹⁰⁵ Pehamberger H, Binder M., Steiner A, Wolff K. In vivo epiluminescence microscopy: improvement of early diagnosis of melanoma. *J. Invest Dermatol* 1993; 100 (Suppl.):356-628.

¹⁰⁶ Buyru N, Altinisik J, Demokan S, Dalay N. P53 genotypes and haplotypes associated with risk of breast cancer. *Cancer Detection and Prevention* 2007; 31, 207–213.

¹⁰⁷ The role of BRAF mutation and p53 inactivation during transformation of a subpopulation of primary human melanocytes. Yu H,

McDaid R, Lee J, Possik P, Li L, Kumar SM, Elder DE, Van Belle P, Gimotty P, Guerra M, Hammond R, Nathanson KL, Dalla Palma M, Herlyn M, Xu X. *Am J Pathol.* 2009;174 :2367-77.

¹⁰⁸ Box N F, Terzian T. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008; 21: 525–533.

¹⁰⁹ Nylander K, Bourdon J, Brayl S E, Gibbs N K, Kay R, Hart I, Hall PA. Transcriptional activation of tyrosinase and TRP-1 by p53 links UV irradiation to the protective tanning response. *J Pathol* 2000; 190: 39-46.

¹¹⁰ Cui R, Widlund H R, Feige E, Lin J Y, Wilensky D L, Igras V E, D’Orazio J, Fung C Y, Schanbacher C F, Granter S R, Fischer D F. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell.* 2007 Mar 9; 128 (5): 853-64.

¹¹¹ Noonan F P, De Fabo E C. UVB and UVA Initiate Different Pathways to p53-Dependent Apoptosis in Melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 2009; 129, 1608–1610.

¹¹² Raj D, Liu T, Samadashwily G, Li F, Grossman D. Survivin repression by p53, Rb and E2F2 in normal human melanocytes. *Carcinogenesis* 2008; vol.29 no.1 pp.194–201.

¹¹³ Yamaguchi Y, Coelho S G, Zmudzka B Z, Takahashi K, Beer J Z, Hearing V J, Miller S A. Cyclobutane pyrimidine dimer formation and p53 production in human skin after repeated UV irradiation. *Exp Dermatol.* 2008 Nov;17(11):916-24.

¹¹⁴ Eller M S, Maeda T, Magnoni C, Atwal D, Gilchrest B A. Enhancement of DNA repair in human skin cells by thymidine dinucleotides: Evidence for a p53-mediated mammalian SOS response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Nov 1997; Vol. 94, pp. 12627–12632

-
- ¹¹⁵ Lu C, Spitz M R, Yang H, Wang W, Stuart D J, Wu X. Genetic polymorphisms in cell cycle control pathways and lung cancer risk: C8-04. *Journal of Thoracic Oncology* 2002; 384
- ¹¹⁶ Bauer J, Garbe C. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res.* 2003 Jun;16(3):297-306.
- ¹¹⁷ Clark WH Jr, Reimer RR, Greene M, Ainsworth AM, Mastrangelo MJ. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. 'The B-K mole syndrome'. *Arch Dermatol.* 1978 May;114(5):732-8.
- ¹¹⁸ Reimer RR, Clark WHJ, Greene MH, Ainsworth AM, Fraumeni JFJ. Precursor lesions in familial melanoma. A new genetic preneoplastic syndrome. *JAMA* 1978;239:744-746
- ¹¹⁹ Lynch HT, Fritchot BC III, Lynch JF. Familial atypical multiple mole-melanoma syndrome. *J Med Genet* 1978;15:352-356
- ¹²⁰ Elder DE, Goldman LI, Goldman SC, Greene MH, Clark WH Jr. Dysplastic nevus syndrome: a phenotypic association of sporadic cutaneous melanoma. *Cancer.* 1980 Oct 15;46(8):1787-94.
- ¹²¹ Holman CD, Armstrong BK. Pigmentary traits, ethnic origin, benign nevi, and family history as risk factors for cutaneous malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst* 1984;72:257-266
- ¹²² Elwood JM, Williamson C, Stapleton PJ. Malignant melanoma in relation to moles, pigmentation, and exposure to fluorescent and other lighting sources. *Br J Cancer* 1986;53:65-74

¹²³ Green A, Bain C, McLennan R, Siskind V. Risk factors for cutaneous melanoma in Queensland. *Recent Results Cancer Res* 1986;102:76–97

¹²⁴ Osterlind A, Tucker MA, Hou-Jensen K, Stone BJ, Engholm G, Jensen OM. The Danish case–control study of cutaneous malignant melanoma. I. Importance of host factors. *Int J Cancer* 1988;42:200–206

¹²⁵ Swerdlow AJ, English J, MacKie RM, O’Doherty CJ, Hunter JA, Clark J. Benign naevi associated with high risk of melanoma. *Lancet* 1984;2:168

¹²⁶ Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1987;17:459–468

¹²⁷ MacKie RM, Freudenberger T, Aitchison TC. Personal risk-factor chart for cutaneous melanoma. *Lancet* 1989;2:487–490

¹²⁸ Garbe C, Buttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Kruger S, Roser J, Weckbecker R, Panizzon, F. Bahmer. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case–control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 1994;102:695–699

¹²⁹ Swerdlow AJ, English J, MacKie RM, O’Doherty CJ, Hunter JA, Clark J, Hole DJ. Benign melanocytic naevi as a risk factor for malignant melanoma. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986;292:1555–1559.

¹³⁰ Grob JJ, Gouvernet J, Aymar D, Mostaque A, Romano MH, Collet AM, Noe MC, Diconstanzo MP, Bonerandi JJ. Count of benign melanocytic

nevi as a major indicator of risk for nonfamilial nodular and superficial spreading melanoma. *Cancer* 1990;66:387–395

¹³¹ Tucker MA, Fraser MC, Goldstein AM, Struewing JP, King MA, Crawford JT, Chiazze EA, Zametkin DP, Fontaine LS, Clark WH Jr. A natural history of melanomas and dysplastic nevi: an atlas of lesions in melanoma-prone families. *Cancer* 2002;94:3192–3209

¹³² Carli P, Naldi L, Lovati S, La Vecchia C. The density of melanocytic nevi correlates with constitutional variables and history of sunburns: a prevalence study among Italian schoolchildren. *Int J Cancer* 2002;101:375–379

¹³³ Gulec A, Seckin D, Saray Y, Sarifakioglu E, Moray G, Colak T. Number of acquired melanocytic nevi in renal transplant recipients as a risk factor for melanoma. *Transplant Proc* 2002;34:2136

¹³⁴ Skender-Kalnenas TM, English DR, Heenan PJ. Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma? *J Am Acad Dermatol* 1995;33:1000–1007

¹³⁵ Sagebiel RW. Melanocytic nevi in histologic association with primary cutaneous melanoma of superficial spreading and nodular types: effect of tumor thickness. *J Invest Dermatol* 1993;100:322S–325S

¹³⁶ Clark WHJ, Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 1984;15: 1147–1165

¹³⁷ Kruger S, Garbe C, Buttner P, Stadler R, Guggenmoos-Holzmann I, Orfanos CE. Epidemiologic evidence for the role of melanocytic nevi as risk markers and direct precursors of cutaneous malignant melanoma.

Results of a case control study in melanoma patients and nonmelanoma control subjects. *J Am Acad Dermatol* 1992;26:920–926

¹³⁸ Dennis LK, White E, Lee JA, Kristal A, McKnight B, Odland P. Constitutional factors and sun exposure in relation to nevi: a population-based cross-sectional study. *Am J Epidemiol* 1996;143: 248–256

¹³⁹ Weiss J, Bertz J, Jung EG. Malignant melanoma in southern Germany: different predictive value of risk factors for melanoma subtypes. *Dermatologica* 1991;183:109–113

¹⁴⁰ Carli P, Biggeri A, Giannotti B. Malignant melanoma in Italy: risks associated with common and clinically atypical melanocytic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1995;32:734–739

¹⁴¹ Green A, Siskind V, Hansen ME, Hanson L, Leech P. Melanocytic nevi in schoolchildren in Queensland. *J Am Acad Dermatol* 1989;20:1054–1060

¹⁴² Garbe C, Buttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Kruger S, Roser M, Weckbecker J, Panizzon R, Bahmer F. Associated factors in the prevalence of more than 50 common melanocytic nevi, atypical melanocytic nevi, and actinic lentiginos: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 1994;102:700–705

¹⁴³ Harrison SL, MacLennan R, Speare R, Wronski I. Sun exposure and melanocytic naevi in young Australian children. *Lancet* 1994;344:1529–1532

¹⁴⁴ Luther H, Altmeyer P, Garbe C, Ellwanger U, Jahn S, Hoffmann K, Segerling M. Increase of melanocytic nevus counts in children during 5

years of follow-up and analysis of associated factors. *Arch Dermatol* 1996;132:1473–1478

¹⁴⁵ Darlington S, Siskind V, Green L, Green A. Longitudinal study of melanocytic nevi in adolescents. *J Am Acad Dermatol* 2002;46:715–722

¹⁴⁶ Abadir MC, Marghoob AA, Slade J, Salopek TG, Yadav S, Kopf AW. Case-control study of melanocytic nevi on the buttocks in atypical mole syndrome: role of solar radiation in the pathogenesis of atypical moles. *J Am Acad Dermatol* 1995;33:31–36

¹⁴⁷ Gallagher RP, McLean DI. The epidemiology of acquired melanocytic nevi. A brief review. *Dermatol Clin* 1995;13:595–603

¹⁴⁸ Kelly JW, Rivers JK, MacLennan R, Harrison S, Lewis AE, Tate BJ. Sunlight: a major factor associated with the development of melanocytic nevi in Australian schoolchildren. *J Am Acad Dermatol* 1994;30:40–48

¹⁴⁹ Fritschi L, McHenry P, Green A, Mackie R, Green L, Siskind V. Naevi in schoolchildren in Scotland and Australia. *Br J Dermatol* 1994;130:599–603

¹⁵⁰ Harrison SL, MacKie RM, MacLennan R. Development of melanocytic nevi in the first three years of life. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1436–1438

¹⁵¹ McLean DI, Gallagher RP. _Sunburn_ freckles, cafe-au-lait macules, and other pigmented lesions of schoolchildren: the Vancouver Mole Study. *J Am Acad Dermatol* 1995;32:565–570

¹⁵² Bataille V, Sasieni P, Cuzick J, Hungerford JL, Swerdlow A, Bishop JA. Risk of ocular melanoma in relation to cutaneous and iris naevi. *Int J Cancer* 1995;60:622–626

¹⁵³ Gallagher RP, McLean DI, Yang CP, Coldman AJ, Silver HK, Spinelli JJ, Beagrie M. Suntan, sunburn, and pigmentation factors and the frequency of acquired melanocytic nevi in children.

Similarities to melanoma: the Vancouver Mole Study. *Arch Dermatol* 1990;126:770–776

¹⁵⁴ Breitbart M, Garbe C, Buttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Kruger S, Breitbart EW, Weckbecker J, Panizzon R, Bahmer F, Tilgen W, Guggenmoos-Holzmann I, Orfanos CE. Ultraviolet light exposure, pigmentary traits and the development of melanocytic naevi and cutaneous melanoma. a case-control study of the German Central Malignant Melanoma Registry. *Acta Derm Venereol* 1997;77:374–378

¹⁵⁵ Ballone E, Passamonti M, Lappa G, Di Blasio G, Fazio P. Pigmentary traits, nevi and skin phototypes in a youth population of Central Italy. *Eur J Epidemiol* 1999;15:189–195

¹⁵⁶ Williams ML, Pennella R. Melanoma, melanocytic nevi, and other melanoma risk factors in children. *J Pediatr* 1994;124:833–845

¹⁵⁷ Easton DF, Cox GM, Macdonald AM, Ponder BA. Genetic susceptibility to naevi – a twin study. *Br J Cancer* 1991;64:1164–1167

¹⁵⁸ Goldgar DE, Cannon-Albright LA, Meyer LJ, Piepkorn MW, Zone JJ, Skolnick MH. Inheritance of nevus number and size in melanoma and dysplastic nevus syndrome kindreds. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:1726–1733

¹⁵⁹ Bataille V, Snieder H, MacGregor AJ, Sasieni P, Spector TD. Genetics of risk factors for melanoma: an adult twin study of nevi and freckles. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:457–463

¹⁶⁰ Briollais L, Chompret A, Guilloud-Bataille M, Bressac-de PB, Avril MF, Demenais F. Patterns of familial aggregation of three melanoma risk factors: great number of naevi, light phototype and high degree of sun exposure. *Int J Epidemiol* 2000;29:408–415

¹⁶¹ Green A, Smith P, McWhirter W, O'Regan P, Battistutta D, Yarker ME, Lape K. Melanocytic naevi and melanoma in survivors of childhood cancer. *Br J Cancer* 1993;67:1053–1057

¹⁶² Smith CH, McGregor JM, Barker JN, Morris RW, Rigden SP, MacDonald DM. Excess melanocytic nevi in children with renal allografts. *J Am Acad Dermatol* 1993;28:51–55

¹⁶³ Holman CD, Armstrong BK. Cutaneous malignant melanoma and indicators of total accumulated exposure to the sun: an analysis separating histogenetic types. *J Natl Cancer Inst* 1984;73:75–82

¹⁶⁴ Elwood JM, Gallagher RP, Hill GB, Pearson JC. Cutaneous melanoma in relation to intermittent and constant sun exposure – the Western Canada Melanoma Study. *Int J Cancer* 1985;35:427–433

¹⁶⁵ Gallagher RP, Elwood JM, Yang CP. Is chronic sunlight exposure important in accounting for increases in melanoma incidence? *Int J Cancer* 1989;44:813–815

¹⁶⁶ Coombs BD, Sharples KJ, Cooke KR, Skegg DC, Elwood JM. Variation and covariates of the number of benign nevi in adolescents. *Am J Epidemiol* 1992;136:344–355

¹⁶⁷ Pope DJ, Sorahan T, Marsden JR, Ball PM, Grimley RP, Peck IM. Benign pigmented nevi in children. Prevalence and associated factors: the West Midlands, United Kingdom Mole Study. *Arch Dermatol* 1992;128:1201–1206

¹⁶⁸ English DR, Armstrong BK. Melanocytic nevi in children. I. Anatomic sites and demographic and host factors. *Am J Epidemiol* 1994;139:390–401

¹⁶⁹ Fusaro RM. Multiple interpretations of cancer risks from body mole counts in preventive care. *Arch Dermatol* 2001;137:823

¹⁷⁰ Landi MT, Baccarelli A, Tarone RE, Pesatori A, Tucker MA, Hedayati M, Grossman L. DNA repair, dysplastic nevi, and sunlight sensitivity in the development of cutaneous malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:94–101

¹⁷¹ Garbe C, Orfanos CE. Epidemiology of malignant melanoma in central Europe: risk factors and prognostic predictors. Results of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *Pigment Cell Res* 1992;Suppl. 2:285–294

¹⁷² Karrer S, Szeimies RM, Stolz W, Landthaler M. Eruptive melanozytare Navi nach Chemotherapie. *Klin Padiatr* 1998;210:43–46

¹⁷³ MacKie RM, McHenry P, Hole D. Accelerated detection with prospective surveillance for cutaneous malignant melanoma in highrisk

groups. Lancet 1993;341:1618-1620

¹⁷⁴ Elwood JM. Screening for melanoma and options for its evaluation.

J Med Screen 1994;1:22-38