



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI

Dipartimento di Scienze Biomediche

DOTTORATO DI RICERCA IN:

SCIENZE MORFOLOGICHE

Ciclo XXV

**Fattori prognostici nel melanoma cutaneo e nel
tumore mammario associati a caratteristiche
molecolari simil-staminali**

Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Morfologiche

Dott. Simone Lai

Tutore: Prof.ssa Paola Sirigu

Coordinatore: Prof.ssa Valeria Sogos

Anno Accademico 2011 – 2012

INDICE

1. Introduzione.....	5
1.1 Melanoma cutaneo.....	6
1.2 Tumore mammario.....	17
1.3 Teoria delle Cellule Staminali Del Cancro (CSCs).....	25
1.4. Melanoma cutaneo e CSCs.....	32
1.5. Tumore mammario T4.....	36
2. Materiali e Metodi.....	39

2.1. Selezione e prelievo dei campioni di melanoma.....	40
2.1.1. Trattamento dei campioni.....	41
2.1.2. Metodica immunoistochimica streptavidina- biotina alcalin-fosfatasi (ABC) applicata ai campioni di melanoma cutaneo.....	42
2.1.3. Controlli.....	45
2.1.4. Valutazione dell'immunoreattività.....	45
2.1.5. Doppia marcatura attraverso il metodo dell'Immunofluorescenza.....	47
2.1.5.1 Controlli.....	48
2.1.6. Valutazione dell'Immunofluorescenza.....	49
2.2. Microscopia confocale a scansione laser.....	49
2.3. Analisi statistica dei dati relativi al Melanoma.....	50

2.4. Selezione e prelievo dei campioni di tumore mammario.....	51
2.4.1 Programma terapeutico.....	52
2.4.2. Valutazione delle risposta alla terapia.....	53
2.5. Metodica immunoistochimica streptavidina-biotina alcalin-fosfatasi (ABC) applicata ai campioni di tumore della mammella.....	54
2.5.1. Controlli.....	56
2.5.2. Valutazione dell'immunoreattività.....	56
2.6. Analisi statistica dei dati relativi al tumore mammario.....	56
3. Risultati.....	58
3.1. Melanoma.....	59

3.1.1. Immunoistochimica ed analisi statistica.....	59
3.1.2. Immunofluorescenza.....	61
3.2. Tumore mammario.....	63
3.2.1. Immunoistochimica.....	63
3.2.2. Analisi statistica.....	64
4. Discussione.....	67
5. Bibliografia.....	80
8. Tabelle.....	109
7. Iconografia.....	115

INTRODUZIONE

La presente tesi raccoglie una serie di risultati sperimentali, ottenuti durante i tre anni di dottorato di ricerca da me svolto, con l'intento di individuare fattori prognostici precoci in due lesioni maligne come il melanoma cutaneo e il carcinoma della mammella.

1.1. Melanoma cutaneo

La cute rappresenta l'interfaccia tra l'ambiente esterno e interno dell'organismo svolgendo un ruolo protettivo nei confronti degli innumerevoli tipi di aggressione fisici (caldo, freddo, radiazioni solari), chimici (sostanze acide o alcaline) e biologici (batteri, virus, funghi), opponendo meccanismi di difesa fisici e biochimici attraverso interazioni cellulari e molecolari.

Inoltre, questa attività di difesa, viene potenziata dalla presenza di un gran numero di recettori tattili, termici e dolorifici. La cute svolge un ruolo preminente nella termoregolazione ed è sede di funzioni metaboliche come la sintesi dei precursori della vitamina D e l'escrezione di urea.

Dal punto di vista strutturale, la cute consta di una parte superficiale, l'epidermide, che risulta costituita da un epitelio e da uno strato profondo, il derma, di natura connettivale. L'epidermide consta di un epitelio pavimentoso composto nel quale dalla profondità fino alla superficie si distinguono: lo

strato germinativo (o Malpighiano), lo strato granuloso, lo strato lucido e lo strato corneo. I principali tipi cellulari riscontrabili a livello dell'epidermide sono i cheratinociti, o cellule squamose, i melanociti, le cellule di Langerhans e le cellule di Merkel.

I cheratinociti, che rappresentano il 90% circa delle cellule dell'epidermide sono organizzati in 4 o 5 strati e sintetizzano la cheratina, una proteina fibrosa e spessa che aiuta a proteggere la cute e i tessuti sottostanti. I melanociti rappresentano circa l'8% delle cellule dell'epidermide, sono situati nello strato basale e producono il pigmento melanina. Sono forniti di grandi nuclei ovali e prolungamenti citoplasmatici, che si estendono tra i cheratinociti a cui trasferiscono i granuli di melanina, e contengono all'interno del proprio citoplasma i melanosomi, organelli ellissoidali costituiti da lamelle concentriche delimitate da membrana.

Il melanoma è una neoplasia maligna che origina dai melanociti presenti nello strato basale dell'epidermide, nei bulbi piliferi, più raramente nelle mucose, nell'occhio, nell'orecchio interno e nelle meningi. La cute è colpita nell'85% circa dei casi. Il melanoma cutaneo rappresenta il 3-5% dei tumori della pelle ed è tra questi il più temibile per la sua elevata propensione a sviluppare metastasi (Boring *et al*, 1991).

Con l'eccezione delle più rare forme amelanotiche (melanoma acromico), il melanoma si presenta come una neoformazione pigmentata, più o meno estesa in superficie ed in profondità, con tendenza all'ulcerazione tardiva e a metastatizzazione per via linfatica ed ematica; può insorgere su cute sana o su un nevo melanocitico acquisito o congenito preesistente; in rari casi l'esordio è di tipo metastatico senza che sia evidente la lesione d'origine.

Dal punto di vista clinico si distinguono i seguenti istotipi: melanoma a diffusione superficiale; melanoma tipo lentigo maligna; melanoma acrale lentiginoso; melanoma muco-cutaneo; melanoma nodulare; forme rare di melanoma (melanoma desmoplastico, nevo blu maligno, ecc.). La variante più frequente è il melanoma a diffusione superficiale, seguito dal melanoma nodulare (Figura 1), dal melanoma tipo lentigo maligna e dal melanoma acrale. I primi quattro istotipi hanno una fase iniziale con diffusione "piana" sulla superficie cutanea, che rappresenta la fase di crescita orizzontale (melanoma piano). Dopo un periodo di tempo variabile, questi tumori possono sviluppare componenti nodulari invasive (melanoma piano-cupoliforme). Al contrario, il melanoma nodulare, fin dal primo momento, è un nodulo invasivo in profondità (melanoma cupoliforme) (Figura 2).

L'incidenza globale del melanoma cutaneo, secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, è in continuo aumento (The World Health Organization, 2005). Numerose ipotesi sono state avanzate per giustificare il sostanziale aumento di incidenza del melanoma, ma la maggior parte degli studi suggerisce che l'esposizione ai raggi solari, aggravata dalla deplezione dei livelli di ozono nell'atmosfera (Henriksen *et al*, 1990; Cummins *et al*, 2006), e ad altre fonti di radiazioni UV, rappresenti il fattore più critico. Attualmente, si stima che ogni anno nel mondo vi siano 132.000 nuovi casi di melanoma. Per quanto riguarda l'Italia, il melanoma cutaneo ha un'incidenza di 14,3 casi ogni 100.000 uomini e 13,6 casi ogni 100.000 donne (AIRTUM, Associazione Italiana Registri Tumori, 2009). A differenza di molte altre neoplasie, il melanoma colpisce individui giovani; infatti oltre il 50% dei casi viene diagnosticato entro i 59 anni d'età.

L'insorgenza del melanoma sembrerebbe correlata a un'esposizione al sole intensa e intermittente, specialmente in aree cutanee non abitualmente fotoesposte, e allo sviluppo di ustioni solari, in particolare nell'età infantile e adolescenziale (Holly *et al*, 1995; Lew *et al*, 1983; Osterlind *et al*, 1988; Whiteman and Green, 1994; Elwood and Jopson, 1997; Oliveria *et al*, 2006). L'esposizione eccessiva alle radiazioni UV gioca un ruolo fondamentale nell'eziologia del melanoma in quanto provoca danni al DNA, alle proteine e

contribuisce alla produzione di radicali liberi, molecole la cui presenza è deleteria per l'organismo e inoltre può ridurre l'efficacia del sistema immunitario. Il melanoma cutaneo è decine di volte più frequente nei soggetti di ceppo europeo (Caucasici), rispetto alle altre etnie, per la relativa mancanza di pigmentazione cutanea (Ries *et al*, 2004). I tassi di incidenza più elevati si riscontrano infatti in aree vicine all'equatore con indici UV (valori di intensità della radiazione ultravioletta solare) significativamente alti, come l'Australia e la Nuova Zelanda, dove i soggetti più colpiti sono di origine Caucasica.

Un'eccessiva esposizione ai raggi solari può danneggiare tutti i tipi di pelle (The World Health Organization, 2005). Le persone di pelle scura (di tipo V e VI) tollerano livelli relativamente alti di esposizione solare. Al contrario, le persone dalla pelle particolarmente chiara, con capelli chiari o rossi e con occhi azzurri, appartengono alla categoria a più alto rischio (pelle di tipo I, II). La popolazione con capelli e occhi scuri e pelle chiara (di tipo III, IV) è inclusa nel gruppo a medio rischio di sviluppare tumori della pelle.

Numerosi altri fattori, alcuni dei quali solo in parte identificati, possono essere coinvolti nell'eziologia del melanoma (Bataille, 2003). Tra i vari fattori di rischio vi è la predisposizione genetica individuale. In un numero elevato di famiglie con predisposizione a sviluppare il melanoma e in pazienti con melanoma multiplo o sporadico è stata rilevata la correlazione tra l'incidenza

del melanoma e mutazioni del gene soppressore tumorale *CDKN2A* (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A) (Kamb *et al*, 1994; Goldstein and Tucker, 2005), localizzato sul locus 9p21 e che codifica per la proteina p16, la quale ha la funzione di indurre l'arresto del ciclo cellulare nella fase G1. Un ulteriore fattore di rischio è rappresentato dalle alterazioni del gene del Recettore 1 della Melanocortina (MC1R) che portano a un'anomala sintesi di melanina. Altre alterazioni geniche coinvolte nell'insorgenza e nella progressione del melanoma riguardano geni che controllano le vie di trasduzione dei segnali proliferativi dalla superficie cellulare al nucleo, come i geni *N-ras* (Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog), *BRAF* (V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) e *PTEN* (Phosphatase and Tensin homolog) (Haluska, 2006; Davies *et al*, 2002; Maldonado *et al*, 2003; Curtin *et al*, 2005; Tsao *et al*, 2000; Haluska *et al*, 2006).

La sopravvivenza media dei pazienti con melanoma, nonostante l'aumento di incidenza, è migliorata negli anni. L'aumento dell'attenzione della popolazione e degli operatori sanitari, e conseguentemente del ricorso a interventi diagnostici, come la biopsia escissionale di lesioni clinicamente dubbie, potrebbe avere portato all'aumento della diagnosi di forme "indolenti" (cioè a lenta crescita) biologicamente poco aggressive, di incerto impatto sulla mortalità. La sopravvivenza a 5 anni è prossima al 90% in caso

di malattia localizzata, mentre risulta inferiore al 20% per le lesioni con metastasi a distanza (Dickman *et al*, 1999). La diagnosi precoce rappresenta attualmente l'arma più efficace nel ridurre sensibilmente la mortalità per melanoma.

La potenzialità di un melanoma primario di sviluppare metastasi può essere valutata utilizzando fattori prognostici clinici e istopatologici. I fattori istopatologici più utilizzati sono: la fase di progressione del tumore, il livello di invasione di Clark, l'indice mitotico, la presenza di satelliti, l'invasione angio-linfatica, i linfociti infiltranti il tumore, la regressione, lo spessore del tumore secondo Breslow, l'ulcerazione e la presenza di metastasi linfonodali:

- *Fase di progressione del tumore.* Un punto cruciale nella comprensione della particolare istologia del melanoma è il concetto di crescita radiale e verticale. Nella fase di crescita radiale, il melanoma non ha la capacità di formare una massa tumorale o di proliferare nel derma. E' in situ, quando rimane confinato all'epidermide, o microinvasivo, quando mostra un'iniziale, focale infiltrazione del derma papillare. La possibilità di metastatizzare è molto rara nei melanomi con crescita radiale (Elder *et al*, 2005); nella fase di crescita verticale (Vertical Growth Phase, VGP), le cellule tumorali, acquisita la capacità di sopravvivere e proliferare nel derma, formano aggregati o

noduli che si estendono al derma reticolare e al sottocute, sviluppando un clone di cellule con capacità metastatizzanti.

- *Il livello di Clark* classifica i melanomi in cinque livelli di invasione (Clark, 1967; Clark *et al*, 1989). Nei melanomi di *livello I*, le cellule tumorali sono confinate all'epidermide, al di sopra di una membrana basale intatta, e costituiscono un melanoma "in situ". Nel *livello II*, le cellule di melanoma hanno la capacità di attraversare la membrana basale, di giungere al derma papillare, senza invaderlo totalmente. Il *livello III* rappresenta un tumore con un nodulo a crescita verticale che si espande nel derma papillare, arrivando all'interfaccia con il derma reticolare. Il *livello IV* è caratterizzato dall'infiltrazione delle cellule tumorali tra le fibre collagene del derma reticolare, il quale rappresenta un ambiente meno "ospitale", per cui le cellule tumorali riescono a sopravvivere per aver acquisito nuove caratteristiche. Il *livello V* è caratterizzato dall'infiltrazione nel tessuto adiposo sottocutaneo.

- *L'indice mitotico* viene definito come il numero di mitosi per mm^2 nell'ambito della fase di crescita verticale del tumore. Un alto indice mitotico predice una prognosi infausta (Elder *et al*, 2005).

- *I satelliti* sono dei piccoli noduli neoplastici che possono essere presenti nel tessuto connettivo, separati dal tumore primitivo, e si pensa rappresentino le "metastasi loco-regionali" (Day *et al*, 1981). La letteratura distingue i

satelliti dalle “*metastasi in-transit*” a seconda che si trovino, rispettivamente, entro o al di là di un raggio di 3 cm dal margine del tumore primario.

- La maggior parte dei satelliti è la conseguenza dell'*invasione angio-linfatica*. Esiste un'associazione tra l'invasione angio-linfatica e una ridotta sopravvivenza (Borgstein *et al*, 1999; Kashani-Sabet *et al*, 2001; Kashani-Sabet *et al*, 2002; Barnhill and Lugassy, 2004).

- Esiste una correlazione tra la densità dei *linfociti infiltranti* il tumore (TILs) e la sopravvivenza (Clark *et al*, 1989; Cook, 1992; Clemente *et al*, 1996; Mihm *et al*, 1996; Tuthill *et al*, 2002). In un modello prognostico (Clark, 1989) la distribuzione dei linfociti infiltranti il tumore viene definita “brisk”, quando una densa banda di linfociti è presente tra le cellule tumorali e l'intera base del tumore o l'intero tumore risultano infiltrati; “non-brisk”, se sono presenti scarsi linfociti; “absent”, quando non sono presenti linfociti.

- La *regressione*, probabilmente derivante dall'azione dei linfociti T citotossici, si presenta come un'area all'interno del melanoma in cui si riscontra fibrosi, infiltrato linfocitario, vasi, melanofagi (Elder *et al*, 2005). Il valore prognostico della regressione è ancora in fase di discussione.

- Il metodo di microstadiazione di Breslow (Breslow, 1970) determina lo *spessore* del tumore in una sezione istologica utilizzando un oculare micrometrico. Lo spessore massimo verticale del melanoma viene misurato

dalla superficie dello strato granuloso (o dalla superficie ulcerata) al punto di massima infiltrazione. I cut off di distinzione dei diversi spessori di tumore sono stati recentemente modificati dall'AJCC rispetto a quelli di Breslow.

Il nuovo sistema di stadiazione dell'American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Balch *et al*, 2009; Balch *et al*, 2004; Balch, 2002) contempla fattori legati al tumore primario, come lo spessore del tumore e l'ulcerazione, i satelliti, la presenza e il numero di linfonodi metastatizzati, la presenza e la sede di metastasi a distanza e i livelli sierici dell'enzima Lattico deidrogenasi (LDH), al fine di ottenere una classificazione dei pazienti associata alla probabilità di sopravvivenza (Figure 3 e 4). *L'ulcerazione* viene definita come una locale perdita di continuità dell'epitelio, con evidenza di una risposta dell'ospite rappresentata da infiammazione, tessuto di granulazione, fibrina, fibrosi e con assottigliamento, perdita o iperplasia reattiva dell'epitelio adiacente alla periferia dell'ulcerazione. Recentemente, è stato dimostrato che l'ulcerazione é il fattore prognostico più rilevante per lesioni spesse più di 1 mm (Balch *et al*, 2001a; Balch *et al*, 2001b; Ronan *et al*, 1988; Balch *et al*, 1979; Shaw *et al*, 1985; Day *et al*, 1981).

Il fattore prognostico di maggiore rilevanza per i melanomi confinati alla sede primaria è lo spessore secondo i criteri di Breslow. Se il melanoma, al momento della diagnosi, risulta ancora confinato agli strati cutanei

superficiali la prognosi è buona. Viceversa, se il melanoma ha raggiunto gli strati più profondi, i rischi per la vita del paziente sono molto elevati. La diagnosi precoce costituisce, unitamente al corretto intervento chirurgico con analisi istopatologica e con la ricerca del linfonodo sentinella, il più favorevole fattore prognostico. Attualmente viene diagnosticato un numero sempre più cospicuo di melanomi cutanei “sottili” (≤ 1 mm), generalmente associati a una buona prognosi, tuttavia una parte di questi può sviluppare recidive e/o metastasi a distanza con esito fatale per i pazienti. Allo stesso tempo, i melanomi più “spessi” possono rimanere localizzati nel sito primario per molti anni. Alla luce di queste osservazioni, è emerso che, sebbene lo spessore secondo Breslow rimanga il più importante fattore prognostico nel melanoma, per le lesioni “sottili” si rende indispensabile anche l'identificazione di altri parametri correlati alla biologia delle cellule tumorali che possano predire la progressione neoplastica e contribuire all'identificazione dei pazienti a maggior rischio di diffusione del tumore, al fine di migliorarne la gestione clinica complessiva.

1.2. Tumore mammario

La ghiandola mammaria a riposo è costituita da un complesso di sistemi duttali principali (da 6 a 10), ognuno dei quali si suddivide in lobuli, le unità funzionali del parenchima mammario (Figura 5 e 6). Ogni sistema duttale drena autonomamente all'esterno attraverso un dotto escretore principale o seno galattoforo. Successive diramazioni dei grossi dotti in senso distale danno origine ai dotti terminali. Prima della pubertà, il complesso sistema dei dotti mammari termina a fondo cieco e al momento del menarca prolifera nella sua porzione distale dando luogo a lobuli costituiti da un aggregato di duttili o acini a rivestimento epiteliale. Ogni duttulo terminale con i suoi acini costituisce l'unità terminale duttulo-lobulare. L'areola e il capezzolo sono rivestiti da un epitelio squamoso stratificato. La cute areolare è pigmentata e sostenuta da muscolatura liscia. Numerose ghiandole areolari (del Montgomery) vanno incontro a ipertrofia durante la gravidanza dato il loro ruolo nella lubrificazione del capezzolo. I dotti galattofori principali si aprono sulla cute di quest'ultimo. L'epitelio squamoso progredendo all'interno degli orifizi duttali si trasforma improvvisamente in un epitelio cubico a doppio strato. Sotto lo strato principale, tra questo e la membrana basale continua che circonda completamente dotti e acini, è possibile identificare un sottile strato di cellule appiattite contrattili, contenenti miofilamenti (cellule mioepiteliali).

La maggior parte dello stroma mammario è composto da tessuto fibroconnettivale denso frammisto a tessuto adiposo (stroma interlobulare) con presenza di fibre elastiche che tra l'altro hanno funzione di sostegno per i dotti maggiori. I lobuli sono contenuti in uno stroma delicato e mixomatosi, sensibile agli stimoli ormonali, tipico della mammella, che contiene sparsi linfociti (stroma intralobulare).

La mammella è caratterizzata da variazioni cicliche. Nella prima metà del ciclo mestruale i lobuli si trovano in uno stato di quiescenza. Dopo l'ovulazione, parallelamente allo stimolo estrogenico e all'aumento dei livelli progestinici, aumenta la proliferazione cellulare ed il numero di acini per ogni lobulo con la comparsa di vacuolizzazione delle cellule basali e aumenta anche l'edema dello stroma intralobulare. Con l'arrivo della mestruazione, la caduta dei livelli ematici estro-progestinici è seguita da fenomeni desquamativi a carico dell'epitelio (apoptosi) scomparsa dell'edema stromale, infiltrazione linfocitaria e complessiva riduzione di volume dei dotti e degli acini. E' con la gravidanza che la mammella raggiunge la sua completa maturazione morfologica e funzionale. Successivamente dopo la terza decade inizia un processo involutivo a carico della componente ghiandolare che si atrofizza e con la riduzione dello stroma intra- e interlobulare.

Nella mammella può insorgere una grande varietà di neoplasie rappresentative della struttura complessa di cui è costituita e della notevole sensibilità agli stimoli ormonali. Nella maggior parte dei casi le lesioni mammarie sono benigne, tuttavia, lesioni maligne come il cancro della mammella rappresentano una comune causa di morte per neoplasia nella donna (Figura 7).

A livello mondiale, il tumore al seno è il più comune tipo di cancro nelle donne, rappresentando il 16% di tutti i tumori femminili. Si stima che oltre 500.000 donne muoiano all'anno a causa del tumore al seno, e anche se esso è ritenuto essere una patologia dei paesi sviluppati, tuttavia la maggior parte (69%) dei decessi si verifica nei paesi in via di sviluppo (WHO, *Global Burden of Disease*, 2004) principalmente per la mancanza di programmi di diagnosi precoce, così come per la mancanza di adeguate strutture per il trattamento (Coleman *et al*, 2008).

Numerosi fattori di rischio sono stati individuati. Tuttavia, non è ancora possibile identificare per ciascun caso lo specifico fattore di rischio (IARC, 2008; Lacey *et al*, 2009). La familiarità aumenta il rischio di sviluppo del tumore di due o tre volte. Alcune mutazioni, in particolare nei geni BRCA1, BRCA2 e p53, determinano un elevato rischio di sviluppare il tumore. Tali

mutazioni risultano in ogni caso rare e giustificano una piccola parte dei casi di tumore.

La prolungata esposizione a estrogeni endogeni, dovuta ad un menarca precoce, a menopausa tardiva, o a all'età avanzata della prima gravidanza, sono tra i più importanti fattori di rischio. Anche gli ormoni esogeni svolgono un importante ruolo. Infatti, le donne che assumono contraccettivi orali o una terapia ormonale sostitutiva, incorrono in un rischio maggiore di sviluppare il tumore. L'allattamento risulta essere invece un importante fattore protettivo (IARC, 2008; Lacey *et al*, 2009).

Altri fattori di rischio legati allo stile di vita e quindi modificabili sono rappresentati da abuso di alcool, sovrappeso, obesità, e inattività fisica. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) ha promosso strategie di controllo dei tumori che comprendono la prevenzione, la diagnosi precoce, il trattamento, la riabilitazione e le cure palliative.

La diagnosi precoce, attraverso un corretto programma di screening sulla popolazione femminile, rimane il metodo più efficace di prevenzione (Anderson *et al*, 2008; WHO, 2007; Yip *et al*, 2008).

L'autopalpazione (Breast Self-examination, BSE) ma soprattutto la mammografia e l'ecografia rappresentano i metodi di screening più efficaci (Figura 8), attraverso i quali la mortalità risulta ridotta a circa il 30% nelle

donne oltre i 50 anni nei paesi sviluppati, nei quali la copertura di screening va oltre il 70% (IARC, 2008; WHO, 2008).

Il tumore della mammella viene caratterizzato e classificato sulla base delle dimensioni del tumore primario (T), dalla presenza di metastasi linfonodali (N) e a distanza (M) al momento della diagnosi, e stadiato secondo il sistema TNM. Il valore prognostico dello stadio di malattia è ben conosciuto, e il suo utilizzo nella pianificazione terapeutica è ormai consolidato.

Negli ultimi decenni, la biologia cellulare e ancora più quella molecolare, hanno aperto ampie prospettive conoscitive. In particolare, lo studio dei meccanismi di ormonosensibilità e del ritmo proliferativo delle cellule tumorali, sono consolidati come indicatori di aggressività biologica e clinica del tumore.

Gli indicatori prognostici, validati o in via di validazione, di tipo morfologico sono i seguenti:

- l'istotipo, che definisce il carcinoma duttale, lobulare, mucinoso, papillare e tubulare, e la discriminazione tra forme invasive e non; i carcinomi duttali rappresentano la forma più frequente di cancro della mammella (70-80% dei casi);

- il grado istologico, limitatamente ai carcinomi duttali invasivi, distinto in grado 1, 2, 3 sulla base della formazione di strutture tubulari, numero di mitosi ed entità di atipie nucleari;
- il grado nucleare, distinto in grado 1, 2, e 3, corrispondenti rispettivamente a un elevato, moderato e scarso differenziamento dei nuclei, definito sulla base della loro forma, atipia e colorabilità;
- l'invasione dei vasi linfatici, ossia la presenza di emboli neoplastici nei vasi linfatici peritumorali;
- gli indicatori di neoangiogenesi tumorale: la capacità di produrre fattori angiogenetici correlati alla malignità del tumore si traduce in una maggiore possibilità d'invasione delle cellule neoplastiche nel circolo ematico, aumentando la possibilità di diffusione metastatica.

Indicatori prognostici di tipo ormonale, validati o in via di validazione, possono essere così riassunti:

- recettori per ormoni steroidei, estradiolo (ER) e progesterone (PgR), come espressione di differenziamento, valutati con metodiche immunometriche e semiquantitative in immunoistochimica; si tratta di un'importante informazione da acquisire, non solo come fattore prognostico, ma anche come importante indicatore terapeutico;

- attività proliferativa: viene quantificata la frazione di cellule in fase S (fase di sintesi del DNA) o tutte le cellule proliferanti. Sono utilizzati indicatori basati sull'incorporazione di timidina triziata o bromodesossiuridina in cellule vitali e valutati con tecniche autoradiografiche e immunoistochimiche o citofluorometriche, e indicatori del contenuto nucleare di DNA in citofluorometria a flusso. Altri approcci relativi all'attività proliferativi si basano sulla rilevazione di enzimi (DNA polimerasi, timidinchinasi), di antigeni legati al processo proliferativo (Ki67, proliferating cell nuclear antigen -PCNA-) o di proteine legate alle regioni organizzatrici del nucleolo (AgNORs). Questi indicatori sono attualmente a un diverso grado di validazione per il loro valore prognostico.

Altri fattori utilizzati come indicatori di prognosi, validati o in via di validazione sono:

- recettori per laminina, gli attivatori del plasminogeno e alcune proteasi come la collagenasi I o la catepsina D sono stati descritti nel processo di metastatizzazione;

- oncogeni, protooncogeni e geni oncosoppressori come *p53*, mutato nel 25-30% dei carcinomi mammari, è un importante indicatore prognostico;

- nm23: è un gene regolatore della proliferazione cellulare. Una sua diminuita espressione e/o la perdita allelica sembrano essere associate a una prognosi peggiore;
- c-erbB-2 o neu: la sua overespressione si associa generalmente a una prognosi peggiore, con dimostrazioni più contrastanti per i tumori N e più concordi nei tumori N+, trattati con polichemioterapia;
- bcl-2: è un protooncogene la cui espressione previene la morte programmata o apoptosi. L'assenza di espressione è un importante fattore prognostico sfavorevole, tuttavia il suo ruolo non è indipendente da quello di p53 con cui è significativamente e inversamente correlato.

1.3. Teoria delle cellule staminali del cancro (CSCs)

Tutte le cellule specializzate del corpo umano derivano da cellule staminali tessuto-specifiche, le quali sono definite dalla loro capacità di auto-rinnovarsi (self-renewal) e differenziarsi.

Il concetto delle Cellule Staminali del Cancro (CSCs), formulato nei tardi anni '90 rappresenta una teoria alternativa al modello della selezione clonale tumorale e identifica l'iniziazione e la progressione tumorale a partire da un'unica cellula mutata (D'Angelo and Wicha, 2010).

Nella teoria clonale, l'eterogeneità del tumore sarebbe il risultato di un costante processo di mutagenesi e selezione delle cellule. Le cellule tumorali per loro natura geneticamente instabili, generano varianti genetiche di cellule soggette a selezione. Tutte le cellule del tumore possiedono la stessa capacità di evoluzione clonale, sono quindi tutte pericolose (Nowell, 1976).

Originariamente l'ipotesi delle CSCs rappresentava un'evoluzione della teoria clonale tumorale in quanto sosteneva che qualsiasi cellula staminale normale, o una sua più differenziata progenie che acquisisce capacità di auto-rinnovamento (Alison *et al*, 2011; Cobaleda *et al*, 2000; Passegue *et al*, 2003;

Conway *et al*, 2009), in seguito a mutazione, darebbe origine a un clone neoplastico di cellule omogenee. Il clone, in seguito a ulteriori mutazioni, si accrescerebbe lungo una via tumorale. Secondo questo modello, detto classico o stocastico, tutte le cellule di un determinato tumore avrebbero lo stesso potenziale tumorigenico (Podberezin *et al*, 2012).

Più recentemente, la teoria cosiddetta del modello gerarchico, suggerisce che ogni tumore consista di una popolazione eterogenea di cellule, ma che solo un'esigua porzione di esse sia da considerare CSCs (Wang and Dick, 2005); sarebbero in grado di auto-rinnovarsi, e sarebbero le uniche responsabili dell'iniziazione e della crescita del tumore.

Due tipi di mutazione possono essere coinvolti in questi processi: l'attivazione di oncogeni o l'inattivazione di geni oncosoppressori. Inoltre, il microambiente della nicchia delle CSCs e il sistema delle citochine giocano un ruolo essenziale nel sostentamento delle CSCs e nella crescita e sviluppo del tumore (Tlsty and Coussens, 2006)

Proprieta' biologiche e origine delle cellule staminali del cancro

Le caratteristiche fondamentali delle CSCs sono rappresentate dall'abilità di auto-rinnovamento, capacità di differenziamento e auto-protezione. E' stato dimostrato che colture cellulari aderenti sparse, ottenute da tessuto epiteliale normale o da carcinomi ben differenziati, generano colonie compatte, a tipica morfologia, chiamate olocloni e composte da piccole cellule dai caratteri epiteliali. Il differenziamento degli olocloni porta a colonie di cellule sempre più grandi, piatte e scarsamente connesse, chiamate merocloni e infine a paracloni. Queste ultime subclonate serialmente, avendo acquisito un certo grado di differenziamento, non sono in grado di riprodurre olocloni. Per contro, la subclonazione degli olocloni è in grado di dare origine ai tre tipi di colonia, dimostrando che le cellule staminali autorinnovantesi possono essere rappresentate solo dagli olocloni (Barrandon and Green, 1987; Locke *et al*, 2005).

Essenzialmente la parte tumorigenica dei carcinomi è quindi rappresentata dagli olocloni, mentre paracloni e merocloni non sarebbero tumorigenici (Li *et al*, 2008; Tan *et al*, 2011).

In colture in sospensione le cellule staminali, sia normali che tumorali, producono singoli aggregati fluttuanti chiamati sfere (Dontu *et al*, 2003; Singec *et al*, 2006). Analogamente agli olocloni, le sfere concentrano

essenzialmente tutta la capacità tumorigenica della popolazione delle cellule del cancro (Grimshaw *et al*, 2008). Tutte le proprietà staminali discusse, come tumorigenicità, clonogenicità, capacità di formare olocloni o sfere, sono preservate in alcune linee cellulari tumorali, anche dopo anni di continue colture.

Le analogie nel comportamento biologico delle cellule staminali normali e del cancro, insieme all'espressione di comuni markers di superficie conducono all'ipotesi che le CSCs derivino da mutazioni di normali cellule staminali somatiche. In alcuni tessuti, come cute, sangue, intestino, l'ipotesi è supportata dal fatto che la maggior parte delle cellule ha una vita breve ad eccezione di quelle staminali, la maggioranza delle quali è praticamente quiescente.

Le cellule staminali normali adulte si dividono per la maggior parte asimmetricamente, producendo un'altra cellula staminale e una seconda cellula un poco più differenziata (cellula precursore). Tale modalità di divisione determina un'omeostasi nel numero di cellule staminali dei tessuti normali. Questa stringente regolazione omeostatica è sicuramente sbilanciata per le CSCs. La crescita del tumore, espansiva, probabilmente dipende da un

bilancio orientato verso la divisione simmetrica per cui entrambe le cellule figlie di una CSC ereditano la caratteristica di staminalità (Figura 9).

La deregolazione della divisione cellulare asimmetrica rappresenta un punto cruciale di distinzione tra cellula staminale normale e tumorale. Fondamentale per la stretta regolazione della divisione è la nicchia della cellula staminale, speciale microambiente che preserva la staminalità e determina la divisione asimmetrica semplicemente per mancanza di spazio nella nicchia per una seconda cellula staminale. Probabilmente la nicchia, attraverso dei particolari cambiamenti, contribuisce alla deregolazione della divisione delle cellule staminali (Hatina and Schulz, 2008).

CSCs e la progressione del tumore

La progressione tumorale consiste nell'accumulo ulteriore di mutazioni oncogeniche delle CSCs che porta all'eterogeneità delle CSCs, con CSCs stazionarie responsabili della crescita del tumore, e CSCs migranti, generate nel fronte d'invasione tumorale, responsabili dell'invasione locale e della disseminazione delle metastasi. In una linea cellulare di carcinoma pancreatico così come in campioni di tumore primario sono state individuate cellule CD133+ (una glicoproteina transmembrana espressa su cellule staminale ematopoietiche, endoteliali e in cellule capaci di differenziazione

neuronale) che risultano altamente tumorigeniche in seguito a trapianto ortotopico. Una sottoclasse di queste cellule coesprime il recettore per le chemochine CXCR4 e queste cellule CD133+ CXCR4+ risultano altamente metastatiche (Hermann *et al*, 2007). CXCR4 é il recettore per lo Stromal Cell derived Factor-1 (SDF-1 = CXCL12), uno dei principali fattori paracrini secreti dai fibroblasti associati al cancro (Pietras and Ostman, 2010). Lo stroma del tumore può quindi agire non solo come elemento associato alla nicchia delle CSCs ma anche promuovere la loro trasformazione in CSCs migranti.

L'Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) è un processo che probabilmente dà origine a cellule con caratteristiche di staminalità (Mani *et al*, 2008; Wellner *et al*, 2009). L'EMT è un evento cruciale in cui alcune cellule del carcinoma perderebbero le caratteristiche epiteliali andando incontro a una transizione morfologica verso un fenotipo fibroblasto-simile. I markers epiteliali come E-cadherina, placoglobina, e desmoplakina vengono persi, mentre vengono espressi markers mesenchimali come vimentina ed N-cadherina. Come risultato, le cellule perdono le loro connessioni intercellulari e diventano mobili, determinando l'invasione locale e la diffusione metastatica. L'EMT indotta sperimentalmente in cellule epiteliali

immortalizzate di ghiandola mammaria umana normale che di carcinoma pancreatico porta, oltre alla trasformazione del fenotipo, anche al drastico aumento della componente in cellule staminali (Mani *et al*, 2008; Wellner *et al*, 2009). Sono stati dimostrati legami tra fenotipo di cellula staminale e EMT. Un altro fattore ambientale che induce le cellule staminali del cancro a migrare, oltre all'influenza dello stroma tumorale, è l'ipossia.

1.4. Melanoma cutaneo e CSCs

Lo sviluppo del melanoma e la sua progressione sono tradizionalmente definiti come processi di sdifferenziamento di melanociti maturi trasformati, con una metamorfosi che va dal nevo alla fase di crescita radiale, quindi alla fase di crescita verticale del melanoma e infine alla malattia metastatica.

La maggior parte dei melanomi si sviluppa nella cute normale o in siti inaspettati lungo il percorso di migrazione delle cellule della cresta neurale e non in nevi displasici (Schatton and Frank, 2008).

Un'ipotesi alternativa a quella tradizionale abbraccia la teoria delle cellule staminali cancerose, suggerendo che cellule melanocitarie staminali o cellule progenitrici immature mutate siano presenti nella cute come precursori di cellule di melanoma (Grichnik *et al*, 2006). In accordo con questa ipotesi recentemente è stato dimostrato che linee cellulari di melanoma metastatico mostrano caratteristiche morfologiche, fenotipiche e funzionali tipiche delle cellule staminali (Grichnik *et al*, 2006; Dou *et al*, 2007).

Recentemente sono stati identificati specifici markers di cellule staminali melanocitarie (Klein *et al*, 2007; Mihic-Probst *et al*, 2007). Fra questi risulta la nestina, un filamento intermedio di classe IV, espresso principalmente nel citoplasma di cellule staminali neuroepiteliali (Lendahl *et al*, 1990; Dahlstrand *et al*, 1992) e nell'endotelio di vasi sanguigni in crescita (Mokry *et*

al, 2004; Mokry *et al*, 2008) ma non in cellule differenziate (Ehrmann *et al*, 2005).

La nestina più recentemente è stata rivalutata come marcatore di neoplasie di origine neuroectodermica. L'aumento dell'espressione della nestina è stato riscontrato in numerosi tumori, inclusi i carcinomi pancreatici, gastro-intestinali, prostatici, mammari e tiroidei (Yamada *et al*, 2009; Strojnik *et al*, 2007; Brychtova *et al*, 2007; Tsujimura *et al*, 2001; Li *et al*, 2007; Kleeberger *et al*, 2007; Liu *et al*, 2010). In numerosi tumori, come il melanoma, la nestina è stata identificata come fattore prognostico (Tanabe *et al*, 2010; Qin *et al*, 2012; Fusi *et al*, 2011; Piras *et al*, 2010; Piras *et al*, 2011).

La nestina assume un ruolo nell'interconnessione delle componenti citoscheletriche e nel coordinamento di cambiamenti nelle dinamiche cellulari (Ishiwata *et al*, 2011). Essa copolimerizza con proteine dei filamenti intermedi di classe III, in particolare con la vimentina, contribuendo al suo disassemblaggio durante la mitosi. Durante lo sviluppo del cervello, la nestina è stata rilevata essere coespressa assieme alla vimentina a partire dalla chiusura della cresta neurale fino alla fine della gliogenesi (Reimer *et al*, 2009).

La vimentina è espressa in maniera ubiquitaria nelle cellule mesenchimali normali e in vari tumori come il tumore della prostata, della mammella, del

polmone, del sistema nervoso e nel melanoma; la sua overespressione correla con un'accelerata crescita e invasività del tumore e con una prognosi infausta (Satelli and Li, 2011; Zhao *et al*, 2008; Lang *et al*, 2002; Singh *et al*, 2003; Fuyuiro *et al*, 2010; Takemura *et al*, 1994; Jin *et al*, 2010; Gilles *et al*, 2003; Korsching *et al*, 2005; Kokkinos *et al*, 2007; Li *et al*, 2010; Chu *et al*, 1996; Trog *et al*, 2008; Bouamrani *et al*, 2010; Upton *et al*, 1986; Al-Saad *et al*, 2008). La vimentina è stata riconosciuta come un marcatore di Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), un processo cellulare che permette alle cellule epiteliali immobili e polarizzate di potersi trasformare in cellule mesenchimali mobili durante numerosi passaggi critici dello sviluppo embrionale (Yang and Weinberg, 2008; Thiery 2002).

Vimentina e nestina, se copolimerizzate, modulano la funzionalità del recettore ai glucocorticoidi (GR) tramite il suo ancoraggio a livello citoplasmatico (Reimer *et al*, 2009). Il GR appartiene alla famiglia dei recettori nucleari che, quando attivato dal proprio specifico ligando, può agire da fattore di trascrizione che lega, nel DNA, il GREs o il GREs negativo.

Esso modula inoltre la risposta infiammatoria, il differenziamento e la proliferazione cellulare (Newton 2000). Il GR attivato dal ligando induce l'arresto della fase G1 o l'apoptosi nei timociti immaturi (Miller *et al*, 2007),

causa una diminuzione della proliferazione dei fibroblasti (Ramalingam *et al*, 1997) e delle cellule epiteliali mammarie indifferenziate (Buse *et al*, 1995; Rogatsky *et al*, 1997) e riduce la proliferazione e differenziazione delle cellule progenitrici neuronali in vivo e in vitro (Almeida *et al*, 2000; Son *et al*, 2001; Sousa *et al*, 1999).

I glucocorticoidi sono stati ampiamente utilizzati nella terapia oncologica. Essi presentano effetti cellulo-specifici pro- o anti-apoptotici. L'attività antitumorale dei glucocorticoidi nel melanoma rimane una questione aperta.

In questo studio, per la prima volta, è stata analizzata l'espressione della nestina, della vimentina e quella subcellulare del GR e la loro colocalizzazione nel melanoma cutaneo tramite metodiche di immunohistochimica, immunofluorescenza e microscopia confocale. Inoltre, è stata valutata l'associazione di questi fattori con le variabili clinicopatologiche.

1.5. Tumore mammario T4

L'International Union Against Cancer (UICC)/American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM staging system (Edge *et al*, 2010), tra tutti i potenziali biomarcatori prognostici per il tumore mammario, considera validi lo spessore del tumore, lo stato linfonodale e la presenza di metastasi a distanza. Infatti, per la maggior parte degli altri fattori prognostici clinico-patologici non esistono definizioni riproducibili e facilmente applicabili e manca un'opinione univoca tra i maggiori esperti mondiali.

In accordo con questo sistema, il tumore mammario primario che si estende fino alla cute è classificato come T4 e i carcinomi T4 di qualsiasi tipo, con o senza coinvolgimento linfonodale e senza metastasi a distanza (T4 N0-2 M0), sono classificati come di stadio IIIB. I carcinomi primari della mammella che infiltrano la cute o la parete toracica (T4 ac), così come i carcinomi infiammatori (T4d, IBC), sono inclusi invece fra i tumori della mammella localmente avanzati (LABC) (Edge *et al*, 2010; Sobin *et al*, 2009). In aggiunta alla dimensione del tumore e al coinvolgimento dei linfonodi ascellari altri fattori prognostici attualmente utilizzati nel tumore mammario includono il sottotipo istologico o grado, lo stato recettoriale per gli estrogeni (ER) e il progesterone (PR), e l'amplificazione del recettore HER2, infine

l'indice di proliferazione Ki-67 (Woodward *et al*, 2003; Subramaniam and Isaacs, 2005).

I tumori LABC rappresentano una sfida clinica poiché la maggior parte delle pazienti sviluppano metastasi a distanza nonostante l'applicazione dei più recenti protocolli terapeutici (Hayes 2005). I meccanismi molecolari alla base degli LABC sono poco conosciuti e la loro comprensione potrebbe contribuire allo sviluppo di nuove e più efficaci terapie.

La nestina, originariamente indicata come importante marcatore di cellule staminali neuronali (Singh *et al*, 2011; Lendahl *et al*, 1990) è stata successivamente associata alla proliferazione di popolazioni di cellule progenitrici nell'ambito di diverse neoplasie come quelle del cervello, il melanoma, il tumore coloretale, prostatico e pancreatico (Zimmerman *et al*, 1994; Strojnik *et al*, 2007; Piras *et al*, 2010; Ehrmann *et al*, 2005; Teranishi *et al*, 2007; Kleeberger *et al*, 2007). Nel tumore mammario, l'espressione della nestina è stata valutata in carcinomi T1, T2 e T3 (Kawamoto *et al*, 2009; Rogelsperger *et al*, 2009; Li *et al*, 2007; Parry *et al*, 2008; Liu *et al*, 2010) ed è stata associata principalmente ai tumori con fenotipo Triple Negative e "basal like". Questi dati suggeriscono la possibilità di utilizzare la nestina come marcatore per il fenotipo Triple negative dei carcinomi T1, T2 e T3.

I tumori T3/T4 rispetto ai T1/T2 mostrano un differente profilo di espressione genica (Van Laere *et al.*, 2007), suggerendo che un distinto ruolo biologico possa caratterizzare i carcinomi mammari di stadio non avanzato rispetto ai LABC (Massidda *et al.*, 2010; Ionta *et al.*, 2010). Alla luce di tali riscontri, lo studio è stato indirizzato all'analisi dell'espressione della nestina in una ben definita coorte di pazienti affette da tumore mammario T4 allo scopo di determinare la sua associazione con i parametri clinici e patologici.

Questo studio è stato concepito con l'intento di individuare marcatori molecolari prognostici precoci nel melanoma e nel tumore mammario, utili per la selezione dei pazienti maggiormente esposti a recidiva/metastasi da indirizzare verso terapie adiuvanti adeguate al tipo di caratteristiche molecolari presenti. Considerando la teoria delle cellule staminali cancerose, lo studio è stato indirizzato verso la ricerca di marcatori molecolari prognostici che potessero essere legati alle caratteristiche staminali delle cellule tumorali.

MATERIALI E METODI

2.1. Selezione e prelievo dei campioni di melanoma

Campioni di melanoma maligno primario a differenti livelli di malignità sono stati ottenuti per escissione chirurgica da 180 pazienti afferenti all'Ospedale Oncologico "Businco" di Cagliari o all'Istituto del Cancer "Solca" di Cuenca (Ecuador) dal Novembre 1995 a Aprile 2008.

Da questo gruppo sono stati selezionati 81 pazienti di cui 44 erano donne e 37 uomini, di età compresa tra gli 10 e i 94 anni (età media 64 anni). I melanomi primari di questi pazienti erano localizzati sulla cute della testa e del collo in 20 pazienti, del tronco in 20 pazienti, degli arti superiori in 12 e degli arti inferiori in 29 pazienti. Sono stati esaminati 64 melanomi primari, di cui 20 erano classificati con livello di Clark I, II e III e 44 con livello di Clark IV e V, e 17 linfonodi metastatici ottenuti da questi pazienti disponibili in blocco di paraffina.

I dati clinico-patologici completi, compreso un follow-up completo fino ad Aprile 2008, erano disponibili per 48 pazienti con melanoma di stadio I e II e per 33 pazienti con melanoma di stadio III e IV, in accordo con il sistema di stadiazione AJCC (Balch 2002). Lo stato linfonodale e la presenza di metastasi sono stati valutati sia con esame clinico che patologico.

Il protocollo dello studio è stato approvato dal comitato etico di ricerca ecuadoriano e italiano, in accordo con la World Medical Association Declaration of Helsinki. Condizione necessaria per l'approvazione era che solo i pazienti deceduti o i quali avessero fornito il consenso informato all'analisi immunohistochimica e all'utilizzo dei dati personali potessero essere inclusi nello studio.

2.1.1. Trattamento dei campioni

Le biopsie sono state fissate in formalina tamponata al 10%, pH 7.4, e processate per l'inclusione in paraffina.

Ciascun campione è stato incluso in diversi blocchetti di paraffina e sezioni seriate di 5 µm di spessore sono state ottenute, mediante taglio al microtomo, dal blocchetto nel quale il tumore presentava il maggiore spessore.

L'area tumorale è stata identificata su sezioni colorate con Ematossilina/Eosina e su sezioni adiacenti marcate immunohistochimicamente per antigeni associati al melanoma, come l'HMB45, la proteina S100 e il Melan A.

Sia i campioni ecuadoriani che quelli italiani sono stati processati nei laboratori del dipartimento di scienze Biomediche dell'università di Cagliari, Italia.

2.1.2. Metodica immunoistochimica streptavidina-biotina alcalin-fosfatasi (ABC)

La seguente metodica è stata utilizzata per la localizzazione di:

- markers tumorali HMB45, S100, Melan A
- marker di cellule staminali embrionali neuroepiteliali nestina
- marker di cellule mesenchimali vimentina
- recettore nucleare dei Glucocorticoidi GR

1. Sparaffinatura delle sezioni di tessuto con passaggi in xilolo, alcool 100°, 95°, 80° e reidratazione in PBS (Phosphate Buffered Saline);
2. smascheramento antigenico:
 - incubazione in tripsina 0.1% in PBS a 37 °C per 5-10 min per gli antigeni HMB45 e S100;
 - esposizione alle microonde per 20 min (5 min x 4 cicli) in una soluzione di citrato di sodio 10 mM, pH 6.0, per l'antigene Melan A;

- immersione in una soluzione di citrato di sodio 10 mM, pH 6.0, a 95 °C in bagno termostato per 40 min, con successivo raffreddamento graduale a temperatura ambiente, per l'antigene GR;
 - non è stato effettuato nessuno smascheramento antigenico per gli antigeni nestina e vimentina;
3. incubazione in PBS al 10% di Normal Horse Serum (NHS) per gli anticorpi monoclonali o Normal Goat Serum (NGS) per quelli policlonali, in camera umida a temperatura ambiente per 45 min;
4. a) incubazione con anticorpo primario monoclonale di topo (l'anticorpo è stato diluito in PBS all'1% di NHS ed i preparati sono stati incubati in camera umida a temperatura ambiente per 1 h):
- Ab anti-Melan A umano (clone A103, Dako, Glostrup, Denmark) diluito 1:100;
 - Ab anti-HMB45 umano (clone HMB45, Dako, Glostrup, Denmark) diluito 1:100;
 - Ab anti- nestina umana (clone 10C2, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) diluito 1:800;
 - Ab anti-GR umano (clone 3D5, Abcam, Cambridge, UK) diluito 1:40;

- b) incubazione con anticorpo primario policlonale di coniglio o di capra, per la rivelazione dell'S100 e vimentina (l'anticorpo è stato diluito in PBS all'1% di NGS, o all'1% di NHS per la rivelazione dell'8-OHdG, ed i preparati sono stati incubati in camera umida a temperatura ambiente per 1 h):
- Ab anti-S100 di vitello (Dako, Glostrup, Denmark) diluito 1:1000 in PBS-Tween 0.2%;
 - Ab anti-vimentina umana ((Millipore, Billerica, MA, USA) diluito 1:2500;
5. incubazione con anticorpo secondario biotinilato anti-mouse, anti-rabbit o anti-goat (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA); l'anticorpo anti-mouse è stato diluito 1:800, gli anticorpi anti-rabbit e anti-goat 1:200 in PBS all'1% di NHS o NGS e i preparati sono stati incubati in camera umida a temperatura ambiente per 30 min;
6. a) incubazione con streptavidina alcalin-fosfatasi (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluita 1:1000 in PBS, in camera umida a temperatura ambiente per 30 min;
- b) incubazione con Fast Red Substrate System (Dako, Glostrup, Denmark) o con Liquid Permanent Red substrate–chromogen system (Dakopatts) in camera umida a temperatura ambiente per 15-60 min;

7. controcolorazione con Ematossilina di Carazzi e montaggio in gelatina-glicerolo (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Le sezioni sono state lavate con PBS (o PBS-Tween 0.2% nella rivelazione dell'S100) tra una fase e l'altra della metodica.

2.1.3. Controlli

I controlli negativi sono stati allestiti sostituendo l'anticorpo primario con siero normale (NHS o NGS) all'1% in PBS.

Sezioni di rene umano sono state utilizzate come controllo positivo per la rivelazione del GR. Sezioni di melanoma che hanno mostrato una forte espressione della nestina e della vimentina sono state utilizzate come controlli positivi per la rivelazione di questi antigeni.

2.1.4. Valutazione dell'immunoreattività

La positività è stata considerata a livello del fronte di invasione tumorale, poiché nell'interfaccia tra tumore e tessuto normale si accumulerebbero popolazioni di cellule maligne scarsamente differenziate con un elevato potenziale di invasività (Brychtova *et al.*, 2007; Piras *et al.*, 2010). La valutazione è stata condotta con il seguente metodo:

- Il fronte di invasione è stato identificato utilizzando campi microscopici adiacenti ad un ingrandimento 400x (Zeiss AxioPhot2 microscope; Carl Zeiss Vision, Hallbergmoos, Germany). In tal modo, è stata valutata un'area tumorale con larghezza pari al diametro del campo microscopico (circa 600µm).
- In queste aree sono stati osservati almeno cinque campi microscopici con ingrandimento 400X; in ciascun campo sono state contate le cellule tumorali positive per nestina o la vimentina o il GR ed è stato ottenuto un valore medio di cellule positive, valutando nucleo e citoplasma separatamente o in combinazione per quanto riguarda il GR, per campo. I casi che presentavano più del 10% di cellule positive con intensità della colorazione moderata o forte sono stati considerati positivi; tutti gli altri casi sono stati considerati negativi.

Sono state utilizzate sezioni adiacenti dello stesso campione e sono stati valutati campi microscopici corrispondenti per l'immunomarcatura di nestina, vimentina e GR.

2.1.5. Doppia marcatura con il metodo dell'Immunofluorescenza

La seguente metodica è stata utilizzata per la simultanea localizzazione di nestina e vimentina o nestina e GR o GR e vimentina:

1. Sparaffinatura delle sezioni di tessuto con passaggi in xilolo, alcool 100°, 95°, 80° e reidratazione in PBS (Phosphate Buffered Saline);
2. smascheramento antigenico:
 - immersione in una soluzione di citrato di sodio 10 mM, pH 6.0, a 95 °C in bagno termostato per 40 min, con successivo raffreddamento graduale a temperatura ambiente, per l'antigene GR; non è stato effettuato nessuno smascheramento antigenico per gli antigeni nestina e vimentina;
3. incubazione in PBS al 10% di Normal Horse Serum (NHS) per gli anticorpi monoclonali o Normal Goat Serum (NGS) per quelli policlonali, in camera umida a temperatura ambiente per 45 min;
4. incubazione over night a 4°C in camera umida con una miscela di 2 anticorpi come precedentemente indicato (l'anticorpo è stato diluito in PBS all'1% di NGS, o all'1% di NHS):
 - Ab anti- nestina umana (clone 10C2, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) diluito 1:100;

- Ab anti- nestina umana policlonale (Chemicon International, Temecula, CA, USA) diluita 1:100;
 - Ab anti-GR umano (clone 3D5, Abcam, Cambridge, UK) diluito 1:40;
 - Ab anti-vimentina umana ((Millipore, Billerica, MA, USA) diluito 1:50;
5. incubazione, in camera umida a temperatura ambiente, al buio per 60 min con i seguenti anticorpi secondari: Donkey Alexa Fluor 594 anti-mouse IgG (H + L), Alexa Fluor 488 anti-goat IgG (H + L) e Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (H + L) (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) diluiti ciascuno 1:200;
6. Le sezioni sono state infine montate in mounting medium Vectashield con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories) per poter visualizzare la componente nucleare.

2.1.5.1 Controlli

I controlli negativi sono stati allestiti sostituendo gli anticorpi primari con siero normale (NHS o NGS) all'1% in PBS.

Sezioni di rene umano sono state utilizzate come controllo positivo per la rivelazione del GR. Sezioni di melanoma che hanno mostrato una forte

espressione della nestina e della vimentina sono state utilizzate come controlli positivi per la rivelazione di questi antigeni.

2.1.6. Valutazione dell'immunofluorescenza

L'analisi dei campioni e la processazione delle immagini è stato effettuata utilizzando il microscopio Zeiss Axioplan 2 (HBO 100 illuminator; mercury vapour, short arc lamp).

2.2. Microscopia confocale a scansione laser

L'analisi delle sezioni è stata condotta mediante l'utilizzo di un microscopio confocale a scansione laser (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) fornito di una lampada ad argon–krypton.

Le immagini confocali delle sezioni marcate con GR, nestina e vimentina, sono state generate utilizzando obiettivi PL Fluotar x40 oil (apertura numerica 1.00) e x100 oil (apertura numerica 1.3). Ogni immagine è stata acquisita otto volte e quindi mediata per ottenere immagini prive di rumore di fondo.

L'ampiezza della distanza tra ogni immagine è stata di 0,5 μ m lungo l'asse Z.

Imaris Release 7.0; Bitplane, Zurich, Switzerland è il software utilizzato per la Surface rendering e per la valutazione dell'effettiva colocalizzazione degli antigeni.

2.3. Analisi statistica dei dati relativi al melanoma

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software SPSS (versione 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL USA).

Le differenze tra l'espressione di nestina, vimentina e GR e la correlazione di questi fattori con le variabili clinico-patologiche come sesso, età, localizzazione del tumore primario, livello di Clark (Clark *et al*, 1989), spessore del tumore, e stadio AJCC è stata analizzata tramite l'utilizzo del test esatto di Fisher o il Pearson's test.

L'analisi del tempo di sopravvivenza nei diversi gruppi di pazienti è stata condotta con il metodo di Kaplan-Meier e le differenze tra i gruppi sono state valutate con il log-rank test. La sopravvivenza globale è stata calcolata dalla data di diagnosi a quella di decesso per melanoma o dell'ultimo follow-up. I pazienti deceduti per altra causa sono stati censurati. Variabili clinico-patologiche, come il sesso, l'età, la localizzazione del tumore primario, il livello di invasione di Clark, lo spessore del tumore, e lo stadio sono state correlate alla sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier. Sono stati

riportati gli intervalli di confidenza del 95% (IC 95%) per la sopravvivenza. Tutti i test erano two-tailed. I risultati dell'analisi statistica sono stati considerati significativi per $P < 0.05$.

2.4. Selezione e prelievo dei campioni di tumore mammario

Campioni di tumore mammario T4 inclusi in paraffina di 53 pazienti afferenti all'Ospedale Oncologico Businco di Cagliari, tra il 1992 e il 2001, sono stati selezionati per questo studio.

Le pazienti sono state sottoposte ad esame clinico e mammografico e la diagnosi di tumore mammario è stata confermata dall'esame dell'ago aspirato. Dati clinico-patologici completi erano disponibili, compreso un follow-up completo fino ad Settembre 2008. Di tredici casi erano disponibili sia l'ago aspirato che il tessuto tumorale proveniente da escissione chirurgica.

Tutte le pazienti hanno completato il protocollo terapeutico che includeva: chemioterapia, intervento chirurgico, radioterapia, terapia adiuvante chemioterapica e terapia ormonale, quando indicato. L'età era compresa fra 32 e 67 anni (mediana 51 anni). La Tabella 5 riassume le caratteristiche clinico-patologiche delle pazienti.

In accordo con l'AJCC) TNM Staging System (Edge *et al*, 2010), i 53 casi di tumore mammario sono stati inclusi nel più alto stadio di patologia non

metastatica (Stadio IIIB). Lo stato recettoriale di Estrogeni (ER) e Progesterone (PR), è stato valutato mediante immunistochemica; una marcatura nucleare $\geq 10\%$ è stata considerata come positiva (in accordo con le indicazioni per le quali esiste una differenza significativa a 5 anni di sopravvivenza libera da recidive tra pazienti ER-positive ed ER-negative con un cut-off del 10%) (Horii *et al*, 2007). Lo stato per HER2 è stato valutato con la metodica dell'ibridazione in situ in fluorescenza (FISH). Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Cagliari. Consenso informato scritto è stato ottenuto da tutte le pazienti.

2.4.1. Programma terapeutico

Tutte le pazienti sono state sottoposte a chemioterapia primaria con antracicline, come FEC (5-Fluorouracil; Epirubicin; Cyclophosphamide) o PEV (Cisplatin; Epirubicin; Vinorelbine). Dopo la chemioterapia neoadiuvante, le pazienti sono state sottoposte a intervento chirurgico, che consisteva in una mastectomia radicale modificata (MRM) o nella chirurgia conservativa (breast-conserving Surgery, BCT). La chemioterapia adiuvante postoperatoria consisteva di sei cicli di CMF (cyclophosphamide, methotrexate, fluorouracil). Durante il quarto ciclo di CMF è stata effettuata radioterapia locoregionale. In seguito, alle pazienti che mostravano positività

ai recettori ormonali è stato somministrato tamoxifene per 5 anni. Esami clinici di controllo sono stati effettuati ogni 3 mesi per i primi due anni, e in seguito ogni 6 mesi.

Esami come mammografia, ecografia del fegato, radiografia toracica, scintigrafia ossea, ed ecocardiogramma sono stati effettuati ogni sei mesi per i primi due anni e in seguito ogni 12 mesi.

2.4.2. Valutazione delle risposta alla terapia

La valutazione clinica della risposta alla terapia neoadiuvante è stata definita in accordo con i criteri della International Union Against Cancer (UICC) (Hayward *et al*, 2007). Completa risposta alla terapia (pCR) è stata definita in seguito all'assenza di cellule tumorali sia nel tessuto mammario che a livello ascellare. La presenza istologica di cellule tumorali nel tessuto mammario o la localizzazione di queste a livello linfonodale, è stata definita come <pCR. Risposta patologica maggiore (MpR) è stata definita nei casi in cui il residuo tumorale non era più grande di 2cm (pT0 plus pT1) (Sataloff *et al*, 1995).

2.5. Metodica immunoistochimica streptavidina-biotina alcalin-fosfatasi (ABC) applicata ai campioni di tumore della mammella

La seguente metodica è stata utilizzata per la localizzazione di un marker di cellule staminali embrionali neuroepiteliali nestina e un marker di cellule endoteliali CD31 su sezioni seriali microtomiche (spessore di 5):

1. Sparaffinatura delle sezioni di tessuto con passaggi in xilolo, alcool 100°, 95°, 80° e reidratazione in PBS (Phosphate Buffered Saline);
2. Immersione in una soluzione di citrato di sodio 10 mM, pH 6.0, a 95 °C in bagno termostato per 40 min, con successivo raffreddamento graduale a temperatura ambiente, per lo smascheramento di CD31;
3. Non è stato effettuato nessuno smascheramento antigenico per la nestina;
4. incubazione in PBS al 10% di Normal Horse Serum (NHS) in camera umida a temperatura ambiente per 45 min;
5. incubazione con anticorpo primario monoclonale di topo (l'anticorpo è stato diluito in PBS all'1% di NHS ed i preparati sono stati incubati in camera umida a temperatura ambiente per 1 h):
 - Ab anti- nestina umana (clone 10C2, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) diluito 1:800;

- Ab anti-CD31 umano (Dako, Glostrup, Denmark; clone JC70A) diluito 1:50;
6. Alkaline phosphatase (AP) conjugated anti-mouse antibodies (Chemicon Int., Temecula, CA, USA; diluizione 1:200) per quanto riguarda la nestina;
 7. incubazione con anticorpo secondario biotinilato anti-mouse, in camera umida a temperatura ambiente per 30 min (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), l'anticorpo anti-mouse è stato diluito 1:800,;
 - incubazione con streptavidina alcalin-fosfatasi (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluita 1:1000 in PBS, in camera umida a temperatura ambiente per 30 min;
 - incubazione con Fast Red Substrate System (Dako, Glostrup, Denmark) o con Liquid Permanent Red substrate–chromogen system (Dakopatts) in camera umida a temperatura ambiente per 15-60 min;
 8. controcolorazione con Ematossilina di Carazzi e montaggio in gelatina-glicerolo (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Le sezioni sono state lavate con PBS (o PBS-Tween 0.2% nella rivelazione dell'S100) tra una fase e l'altra della metodica.

2.5.1. Controlli

I controlli negativi sono stati allestiti sostituendo l'anticorpo primario con siero normale (NHS) all'1% in PBS.

Sezioni di melanoma che hanno mostrato una forte espressione della nestina sono state utilizzate come controllo positivo.

Per poter confermare l'effettiva natura dei vasi, la marcatura della nestina e del CD31 è stata condotta su sezioni adiacenti.

2.5.2. Valutazione dell'immunoreattività

Le sezioni sono state analizzate mediante l'utilizzo di un microscopio Zeiss Axiophot (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany).

L'intera area tumorale di ogni campione è stata valutata a un ingrandimento di 200X con un reticolo a 144 punti di intersezione (0.78 mm^2) inserito nell'oculare e sono state contate le cellule immunoreattive alla nestina per ciascun campo; è stato quindi considerato il valore medio per campo di tutti i campi costituenti l'area tumorale.

L'espressione della nestina è stata valutata secondo i seguenti criteri: casi con <10% di cellule inequivocabilmente neoplastiche con espressione citoplasmatica della nestina sono stati classificati come negativi, mentre casi

con un numero di cellule positive neoplastiche $\geq 10\%$ sono stati considerati positivi.

2.6. Analisi statistica dei dati relativi al tumore mammario

La valutazione dell'associazione tra variabili come l'espressione della nestina, ER, PR, HER2 e la guarigione in termini di risposta al trattamento, e della correlazione tra l'espressione della nestina e le variabili clinicopatologiche come l'età, il grado, le metastasi linfonodali, lo status dei recettori ormonali e di HER2, è stata effettuata attraverso il test esatto di Fisher e il Pearson's test.

L'analisi univariata tra variabili prognostiche e tempo di sopravvivenza è stata condotta mediante il test di Kaplan-Meier e le differenze tra i gruppi sono state valutate con il log-rank test.

Il tempo di sopravvivenza dei pazienti è stata calcolato a partire dalla data del primo trattamento chemoterapico fino alla data di morte causata da carcinoma della mammella o fino all'ultimo follow-up disponibile a Settembre 2008. I dati delle pazienti decedute per altra causa sono stati censurati.

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando SPSS Statistical Package for Social Science, versione 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Tutti i test erano two-tailed e i valori di $P < 0.05$ sono stati ritenuti statisticamente significativi.

RISULTATI

3.1. Melanoma

3.1.1. Immunoistochimica e analisi statistica

Le cellule positive simultaneamente alla nestina, vimentina, e al GR erano maggiormente concentrate nel fronte di invasione tumorale e nelle aree periferiche dei piccoli noduli presenti all'interno della massa tumorale (Figura 10).

Non sono state riscontrate differenze significative tra i tumori primari e le metastasi linfonodali nell'espressione di nestina, vimentina o GR ($P > 0.05$).

L'associazione tra la localizzazione subcellulare del GR con l'espressione di nestina o vimentina o con gli altri fattori è mostrata in Tabella 1.

L'espressione della nestina e della vimentina era rilevabile a livello citoplasmatico nelle cellule tumorali non pigmentate e nelle cellule endoteliali della maggior parte dei casi in esame.

Nestina e vimentina erano espresse nel compartimento citoplasmatico delle cellule neoplastiche del fronte di invasione rispettivamente nel 72,8% e nel 82,7% dei casi. Tra questi, il 65% dei campioni ha mostrato concomitante espressione di nestina e vimentina nelle cellule tumorali, e questa associazione è risultata statisticamente significativa ($P = 0.009$).

L'espressione del GR è stata osservata come nucleare, o citoplasmatica, o nucleare e citoplasmatica in combinazione, rispettivamente nel 37%, nel 39,5% e nel 23,5% dei casi (Figura 11). Inoltre, l'espressione del GR era significativamente associata a quella della nestina e il 44% dei campioni nestina-positivi risultavano positivi anche al GR citoplasmatico, mentre più del 60% dei campioni negativi alla nestina presentavano una marcatura nucleare del GR ($P = 0.008$). L'espressione del GR era associata anche allo spessore e al livello di Clark (rispettivamente $P = 0.003$ and $P < 0.001$). Più del 50% dei casi con spessore elevato e livello di Clark avanzato mostravano espressione citoplasmatica del GR e più del 60% degli stessi casi mostravano espressione nucleare di GR.

Nessuna correlazione significativa è stata rilevata tra la positività per il GR e per la vimentina ($P > 0.05$).

Per determinare se la concomitante presenza di nestina e vimentina influenzasse in qualche modo la localizzazione subcellulare del GR tutti i campioni sono stati suddivisi in due distinti gruppi: il primo includeva quei casi in cui non c'era espressione di nestina e/o vimentina, e il secondo quelli che esprimevano sia nestina che vimentina. Nel primo gruppo, il GR era espresso prevalentemente a livello nucleare, mentre nel secondo gruppo era prevalentemente a livello citoplasmatico (Tabella 2) ($P = 0.008$).

Inoltre, la concomitante espressione di nestina, vimentina e GR a livello citoplasmatico era associata significativamente al livello di Clark e allo spessore del tumore (rispettivamente $P = 0.02$ e $P = 0.029$, Tabella 3). Le cellule del fronte di invasione tumorale dei campioni con concomitante espressione di nestina, vimentina e GR citoplasmatico risultavano non pigmentate.

L'analisi di Kaplan-Meier ha dimostrato che la concomitante presenza di nestina, vimentina e GR citoplasmatico, predice significativamente una prognosi infausta nei pazienti con melanoma di stadio III e IV ($P = 0.020$, Tabella 4). Secondo l'analisi di sopravvivenza il gruppo con concomitante espressione di nestina, vimentina e GR citoplasmatico mostrava la peggior prognosi rispetto al gruppo che invece non mostrava colocalizzazione nel citoplasma delle cellule neoplastiche ($P = 0.006$).

L'analisi multivariata, aggiustata per lo stadio AJCC, non ha dimostrato alcun valore prognostico per gli altri fattori clinicopatologici ($P > 0.05$).

3.1.2. Immunofluorescenza

All'interno dei campioni che esprimevano sia nestina che vimentina più dell'80% di cellule positive mostravano la loro colocalizzazione (Figura 12); fra queste cellule, più del 50% mostrava anche GR a livello citoplasmatico; la

maggior parte delle cellule positive per il GR citoplasmatico erano positive anche per la vimentina.

Queste osservazioni sono state pienamente confermate dalla microscopia confocale a scansione (Figura 13).

3.2. Tumore mammario

3.2.1. Immunoistochimica

La nestina risultava espressa in un'ampia varietà di cellule, comprese le cellule tumorali, le cellule endoteliali di vasi sanguigni di piccole dimensioni, le cellule basali di ghiandole mammarie apparentemente normali e le cellule con morfologia fibroblastica dello stroma peritumorale (Figura 14). Queste ultime erano particolarmente concentrate intorno ai dotti ghiandolari e ai vasi. Il CD31 era espresso nelle cellule endoteliali dei vasi e in cellule sparse di tutti i campioni.

Sono stati considerati negativi i casi in cui la nestina era presente nel tessuto periferico di dotti o/e vasi, o/e nello stroma peritumorale ma non nelle cellule tumorali. Più specificatamente è stata definita come positività per la nestina solo l'espressione rilevabile in cellule inequivocabilmente tumorali e non di cellule positive della periferia del tumore. Per esempio, un carcinoma in cui lo strato basale/mioepiteliale risulta colorato immunoistochimicamente per la nestina ma non le cellule interne al tumore è stato valutato come negativo.

3.2.2. Analisi statistica

Il 53% dei casi esaminati mostrava più del 10% di cellule tumorali positive per la nestina. Tutti i casi mostravano espressione della nestina in cellule sparse con morfologia apparentemente angioplastica e in cellule endoteliali di microvasi. Il 70% dei casi mostrava espressione della nestina in cellule con morfologia fibroblastica. Nessuna differenza nell'espressione della nestina è stata rilevata fra le agobiopsie e i campioni ottenuti per escissione chirurgica dei 13 casi di cui entrambi i campioni erano disponibili.

Il test di Pearson e il test esatto di Fisher sono stati utilizzati per valutare l'associazione dell'espressione della nestina con le caratteristiche istologiche del tumore e/o con le variabili cliniche (Tabella 5). Una differenza statisticamente significativa è stata rilevata nell'espressione della nestina dei tumori mammari infiammatori e non infiammatori ($P=0.016$). Fra i pazienti che avevano un tumore iniziale infiammatorio (T4d), l'80% era nestina-positivo. La nestina era particolarmente espressa nei tumori triple-negative rispetto a quelli non triple-negative. I risultati indicano che nell'83% dei tumori triple-negative, l'espressione della nestina era chiaramente rilevabile ($P=0.002$). L'associazione fra lo status dei recettori ormonali e l'espressione della nestina risultava statisticamente significativa ($P=0.029$): il 25% dei casi positivi per la nestina avevano fenotipo luminale (ER+, PR+) e il 71% aveva

status dei recettori ormonali completamente negativo (ER-, PR-). L'associazione fra lo status dei recettori per gli estrogeni e l'espressione della nestina ha mostrato che il 72% dei casi ER negativi erano nestina-positivi (P=0.013). L'associazione fra lo status dei recettori per il progesterone e l'espressione della nestina ha mostrato che il 64% dei casi PR negativi erano nestina-positivi (P=0.037). Nessuna associazione significativa è stata rilevata fra l'espressione della nestina nelle cellule tumorali e l'età delle pazienti, la presenza di metastasi linfonodali ascellari, lo status HER2, il grading, e la risposta clinica o patologica alla chemoterapia primaria neoadiuvante. Nessuna correlazione è stata trovata fra l'espressione della nestina nelle cellule tumorali e nelle cellule stromali con morfologia fibroblastica (P=1). In particolare, l'espressione stromale della nestina è stata osservata in 12 dei 18 casi triple-negative (67%) e in 8 dei 15 casi di tumore mammario infiammatorio (53%). Nessuna associazione statisticamente significativa è stata trovata fra l'espressione stromale della nestina e il fenotipo triple-negative (P=0.77) o infiammatorio (P=0.53).

Nella Tabella 5 si può anche osservare che, attraverso un'analisi con il metodo di Kaplan-Meier, soltanto il coinvolgimento linfonodale, lo status triple-negative e la risposta alla chemoterapia primaria, fra tutti i fattori

clinico-patologici valutati, risultavano significativamente correlati con il tempo di sopravvivenza ($P < 0.05$).

L'analisi con il metodo di Kaplan-Meier ha mostrato che la presenza della nestina nelle cellule tumorali delle pazienti con tumore mammario T4 significativamente era predittiva di prognosi infausta a 5 anni di sopravvivenza (Figura 15; $P = 0.02$) e con un valore borderline della significatività a 10 anni di sopravvivenza dalla diagnosi (Figura 16; $P = 0.05$). Oltre i 10 anni di sopravvivenza la presenza della nestina perde il suo valore prognostico ($P = 0.09$). I dati derivanti dalle analisi statistiche sono mostrati nella Tabella 6.

DISCUSSIONE

Il melanoma rappresenta la forma più aggressiva di tumore della pelle. Esso possiede notevole resistenza alle attuali modalità terapeutiche in quanto le cellule tumorali sfruttano una loro un'intrinseca resistenza all'apoptosi e riprogrammano le vie di proliferazione e sopravvivenza tramite l'attivazione di fattori anti-apoptotici, l'inattivazione di fattori pro-apoptotici e/o il potenziamento di segnali di sopravvivenza (Soengas *et al*, 2003).

Questo studio ha analizzato, lungo il fronte di invasione tumorale, la presenza della nestina, un marker di cellule staminali embrionali neuroepiteliali, della vimentina, un marker mesenchimale, e del GR, un fondamentale regolatore della crescita e differenziazione nei tessuti embrionali e nei tessuti immaturi.

La nestina era espressa in più del 70% dei casi di melanoma in esame. Recenti studi hanno mostrato che l'espressione della nestina è più alta nei casi di melanoma in stadio molto avanzato e nei foci metastatici. Nei pazienti con melanoma di stadio I e II risulta predittiva di prognosi infausta (Piras *et al*, 2010). E' stato messo in evidenza che la nestina viene espressa maggiormente dalle cellule tumorali del fronte di invasione della massa neoplastica, dove si accumula una popolazione cellulare meno matura di cellule maligne con un più elevato potenziale invasivo. Infatti, nell'interfaccia tumore-tessuto normale i vasi sanguigni di neoformazione riforniscono il tumore in crescita di una maggiore quantità di ossigeno e glucosio, ed inoltre facilitano il

processo metastatico anche per la maggiore permeabilità alle cellule tumorali della parete dei vasi sanguigni immaturi (Piras *et al*, 2010). In questo contesto viene suggerito un importante ruolo della nestina nella migrazione e nell'invasione delle cellule di melanoma.

Questi risultati sono stati confermati dal presente studio, indicando che la nestina può essere utilizzata come marker specifico di staminalità nel melanoma.

La vimentina, che rappresenta un marker specifico di EMT e un fattore predittivo di metastasi emotogena (Li *et al*, 2010; Mikesch *et al*, 2010), era espressa nella maggior parte dei casi esaminati in questo studio. L'EMT è un processo che determina la modificazione della morfologia delle cellule e ne aumenta la motilità. Poiché l'EMT dà origine a cellule con caratteristiche di staminalità, essa è stata associata all'acquisizione di chemo- e radio-resistenza in colture cellulari (Yang *et al*, 2008; Thiery, 2002; Liu e Brown, 2010). È noto che le cellule di melanoma frequentemente esprimano vimentina, suggerendo che un certo grado di transizione mesenchimale possa essere costitutiva di alcuni melanomi (Mikesch *et al*, 2010). Tali caratteristiche possono spiegare l'elevata invasività del melanoma e la sua resistenza alla radioterapia e alla chemioterapia.

Alcuni autori hanno messo in evidenza che i glucocorticoidi determinano citotossicità ed effetti anti-angiogenetici in cellule di melanoma murino; altri ancora hanno dimostrato regressione delle metastasi viscerali dovute a melanoma in seguito ad adrenalectomia (Banciu *et al*, 2008; Collison *et al*, 2008). Esperimenti *in vitro* hanno tuttavia mostrato che derivati dei glucocorticoidi, come il desametasone, non determinano modificazioni biologiche dirette sulla proliferazione o sulla migrazione della maggior parte delle linee cellulari di melanoma studiate. In ogni caso, il trattamento delle cellule di melanoma della linea WM983A con desametasone a dosi elevate determina un'inibizione della crescita (Dobos *et al*, 2011). Di conseguenza, questi dati sembrano dimostrare un importante ruolo svolto dal recettore per i glucocorticoidi e il suo ligando nelle dinamiche del melanoma.

In questo studio l'immunocolorazione del GR è stata sempre osservata in tutti i campioni di melanoma, sia nei tumori primari che nelle metastasi linfonodali, con una variabilità nel numero delle cellule positive e nell'intensità della colorazione.

L'importanza funzionale del GR può essere dedotta dal compartimento cellulare nel quale esso risiede, nucleare o citoplasmatico, per cui in questo studio è stata data una particolare enfasi alla sua localizzazione subcellulare nelle cellule di melanoma.

L'espressione del GR ha mostrato un pattern eterogeneo, con positività prevalentemente nucleare o citoplasmatica, oppure sia nucleare che citoplasmatica in combinazione. La presenza del GR nel citoplasma delle cellule di melanoma, determinata immunohistochimicamente, era correlata in maniera significativa con i tumori dallo spessore maggiore e dal livello di Clark più alto. Questi risultati suggeriscono che l'espressione del GR nel citoplasma delle cellule tumorali possa essere coinvolta nei meccanismi di proliferazione. Reimer e collaboratori (Reimer *et al*, 2009) hanno dimostrato che, nel tessuto embrionale di topo e in cellule umane indifferenziate, l'accumulo citoplasmatico del GR è determinato dalla nestina in congiunzione con la vimentina, copolimerizzate in un sistema di filamenti intermedi. L'ancoraggio del GR al complesso eterodimerico nestina-vimentina sarebbe, secondo Reimer, correlato al mantenimento di un alto indice di proliferazione. Similmente, in questo studio è stato riscontrato che la simultanea presenza di nestina e vimentina nelle cellule di melanoma, individuata tramite immunohistochimica e immunofluorescenza e confermata tramite microscopia confocale a scansione laser, correlava in maniera statisticamente significativa con la localizzazione citoplasmatica del GR, mentre le cellule di melanoma che non mostravano la simultanea presenza di nestina e vimentina accumulavano preferenzialmente il GR a livello nucleare.

Inoltre, la colocalizzazione citoplasmatica di nestina, vimentina e GR lungo il fronte di invasione tumorale, correlava con uno spessore maggiore del tumore e con un livello di Clark più alto, suggerendo l'ipotesi che l'ancoraggio del GR al complesso nestina-vimentina possa contribuire al mantenimento di un alto indice di proliferazione delle cellule tumorali, in maniera del tutto simile a quanto accade durante lo sviluppo embrionale. Poiché le cellule si presentavano tutte senza pigmentazione, la colocalizzazione citoplasmatica di GR, nestina e vimentina potrebbe determinare il mantenimento di uno stato immaturo delle cellule tumorali tramite il blocco della loro differenziazione. Nei pazienti di stadio III e IV, inoltre, la colocalizzazione citoplasmatica di vimentina, nestina e GR è risultato un fattore prognostico infausto.

Questi risultati dimostrano per la prima volta, la presenza di meccanismi di crescita del melanoma che coinvolgono GR, nestina e vimentina, in maniera simile a quanto accade nelle cellule indifferenziate. Per di più, la localizzazione immunohistochimica della vimentina, un marker specifico di EMT, e della nestina, un marker di cellule staminali, può suggerire l'esistenza di un programma di EMT in associazione con un fenotipo staminale.

Questi risultati potrebbero migliorare la comprensione della biologia del tumore, e fornire delle basi molecolari che possano rendere le cellule di melanoma sensibili alle terapie cliniche.

In questo studio è stata altresì valutata la distribuzione dell'espressione della nestina nel tumore mammario e l'impatto dell'espressione di questa proteina come fattore predittivo e prognostico fra le pazienti con carcinoma mammario di tipo T4.

L'immunocolorazione della nestina era osservabile in oltre la metà dei tumori esaminati e la sua espressione era correlata con lo stato infiammatorio e lo stato dei recettori ormonali.

Il tumore mammario infiammatorio è una forma specifica e aggressiva di LABC, caratterizzata da un elevato potenziale metastatico e angiogenetico (Van der Auwera *et al*, 2004; Bertucci *et al*, 2004; Bertucci *et al*, 2010), e da una prognosi infausta. È stato dimostrato che l'IBC mostra un distinto profilo di espressione genica rispetto al non-IBC (Van Leare *et al*, 2007). Nello studio di Bertucci *et al*, in confronto al gruppo con numerosi NIBC, il gruppo di tumori con molti IBC esibiva un'overespressione di gruppi genici basali, immuni e vascolari e una ridotta espressione del cluster luminale (Bertucci *et al*, 2004). Questi cambiamenti dei profili di espressione sono compatibili con le caratteristiche fenotipiche dell'IBC ed NIBC, e suggeriscono che l'IBC sia relativo ad un lignaggio basale più frequentemente dell'NIBC (Bertucci *et al*, 2004; Bertucci *et al*, 2010). I casi IBC di questo studio hanno mostrato una marcata differenza nell'espressione della nestina in confronto ai casi non-IBC,

con l'80% dei casi IBC positivi per l'espressione della nestina. In uno studio recente coespressione di nestina e del recettore 1 per la melatonina (MT) è stata osservata in pazienti con un alto stadio tumorale (TII/III), suggerendo che l'espressione di nestina ed MT1 possa correlare con un tumore mammario invasivo e avanzato (Rogelsperger *et al*, 2009). Emboli linfovaskolari di carcinoma mammario infiammatorio, che è caratterizzato da un'abnorme invasione linfovaskolare, esprimono i markers di cellule staminali, fra i quali la nestina (Xiao *et al*, 2008; Ishiwata *et al*, 2011). I risultati del presente studio sono in accordo con questi dati e indicano che la nestina è associata ad un fenotipo di crescita aggressiva. Questo fenotipo stem-like, caratterizzato da una forte espressione di numerosi markers di angiogenesi (Xiao *et al*, 2008), inclusa la nestina, potrebbe contribuire alla natura aggressiva dell'IBC attraverso un meccanismo metastatico in cui un aumentato numero di vasi del tumore aumenta le possibilità per le cellule tumorali di entrare in circolo. I vasi o capillari tumorali di neoformazione presentano membrane basali permeabili e sottili per cui le cellule tumorali possono attraversarle più facilmente rispetto ai vasi maturi.

In questo studio la nestina è stata osservata nelle cellule endoteliali di numerosi microvasi in tutti i casi di tumore mammario esaminati. In accordo con diversi lavori, che indicavano la nestina come un marker di angiogenesi

per le cellule endoteliali in proliferazione (Piras *et al*, 2010; Teranishi *et al*, 2011; Mokřý *et al*, 2004; Mokřý *et al*, 2008) di molti tessuti tumorali, i risultati di questo studio mostrano la colorazione della nestina come indicatore di cellule endoteliali di nuova formazione e di un rimarcabile coinvolgimento di questa proteina nell'angiogenesi e nella vasculogenesi del tumore mammario.

Studi recenti hanno esaminato la distribuzione della nestina in differenti fenotipi recettoriali di tumori mammari T1, T2 e T3. La nestina è risultata intensamente espressa nel sottotipo di tumore mammario basale (ER α -/PR-/Her2-) ma non nel sottotipo Her2(ER α -/PR-/Her2+) o nel fenotipo epiteliale luminale (ER α + /PR+) (Li *et al*, 2007). In accordo con questi dati uno studio recente ha mostrato che i carcinomi mammari triple-negative presentano una maggiore espressione di nestina rispetto agli altri tumori mammari (Liu *et al*, 2010). Un altro studio ha riportato una significativa elevata espressione di nestina nei tumori mammari basal-like e triple-negative in una coorte di pazienti con tumore mammario invasivo trattato chirurgicamente e in seguito con chemioterapia basata sulle antracicline (Parry *et al*, 2008).

In questo studio, la nestina è apparsa preferenzialmente espressa nei carcinomi triple-negative e correlata con l'assenza di ER e PR, mentre essa

risultava scarsamente espressa nei fenotipi luminali. Questi dati supportano i risultati di lavori precedenti e sebbene il coinvolgimento della nestina nei meccanismi molecolari dei triple-negative sia ancora oscuro, essi indicano che la nestina potrebbe rappresentare un marker selettivo del fenotipo triple-negative e del sottotipo basale, i quali mostrano una modalità di crescita aggressiva e hanno una cattiva prognosi nello stadio IIIB T4 di tumori mammari localmente avanzati.

I tumori mammari sono tessuti istologicamente complessi in quanto contengono una grande varietà di tipi cellulari in aggiunta alle cellule tumorali come le cellule endoteliali, le cellule adipose/normali ghiandolari, linfociti B, T, macrofagi e cellule stromali. In questo studio, nello stroma peritumorale, cellule con morfologia fibroblastica erano positive per la nestina. Questo è un importante risultato, poiché è ormai sempre più evidente che interazioni epitelio-stromali sono cruciali per lo sviluppo del tumore e che i fibroblasti del microambiente tumorale sono coinvolti nell'angiogenesi, nella crescita e nell'invasione tumorale (Tlsty and Coussens, 2006; West and Van de Rijn, 2007; Sellheyer and Krahl, 2007).

Inoltre, l'espressione della nestina è stata associata ad un più breve tempo di sopravvivenza ed è stato mostrato che essa è un fattore prognostico indipendente del tumore mammario (Liu *et al*, 2010). I risultati di questo

studio hanno indicato che il sottogruppo di pazienti con tumore mammario T4, con nestina espressa nel tumore primario, presentava i peggiori valori di sopravvivenza a 5 e 10 anni dalla diagnosi rispetto ai casi senza espressione della nestina. Poiché è stato già dimostrato che un'aumentata espressione della nestina nei tessuti tumorali correla con un infelice "outcome" clinico in un certo numero di neoplasie (Xiao *et al*, 2008), i risultati di questo studio indicano con chiarezza un analogo significativo impatto sulla prognosi di questa alterazione molecolare fra le pazienti con tumore mammario T4. Infatti, sebbene il ruolo della nestina nel tumore mammario non sia stato ancora ben caratterizzato, sembra evidente che questa proteina possa essere coinvolta nella regolazione della mitosi (Li *et al*, 2007; Chou *et al*, 2003; Sahlgren *et al*, 2001) e dell'invasività del tumore (Yang *et al*, 2008). Fra le variabili clinico-istologiche valutate, soltanto lo status di triple-negative, il coinvolgimento linfonodale e la risposta clinica dopo la chemoterapia primaria risultavano significativamente correlati con la sopravvivenza globale. Il ruolo di queste variabili come fattori prognostici e predittivi è già stato ben definito; tuttavia, la considerazione di biomarkers addizionali strettamente relativi alla biologia delle cellule tumorali, come la nestina, potrebbe migliorare l'accuratezza della diagnosi o determinare il rischio per

guidare la selezione di interventi terapeutici ottimali che siano supporto verso una medicina più personalizzata.

In questo studio, l'espressione della nestina non sembra essere significativamente correlata con la risposta alla chemioterapia primaria; tuttavia è da notare che nessun cambiamento nell'espressione della nestina è stato trovato fra gli agoaspirati e i campioni chirurgici dello stesso paziente.

Tali risultati mostrano che la nestina è espressa in maniera consistente nei sottogruppi di tumore mammario IBC e triple-negative T4. L'espressione della nestina può caratterizzare tumori clinicamente aggressivi suggerendo che la presenza della nestina nelle cellule tumorali e nei vasi possa essere considerata un importante fattore che conduce ad una cattiva prognosi. Al fine di rendere valido l'incorporamento della nestina come marker per la gestione clinica di questi tumori, si rendono necessari comunque ulteriori ed ampi studi. Inoltre, una più approfondita conoscenza dell'eziologia di questi tumori può aiutare nell'identificazione di markers selettivi e bersagli terapeutici che potranno migliorare la diagnosi e il trattamento dei carcinomi mammari.

Conclusioni

I risultati di questa tesi sono compatibili con il comportamento atteso da tumori che si sviluppano attraverso caratteristiche biologiche staminali. Complessi meccanismi molecolari che coinvolgono marcatori staminali come la nestina, la vimentina e il recettore per i glucocorticoidi e probabilmente portano ad un processo di transizione verso un fenotipo molecolare staminale sembrano trovarsi alla base della progressione tumorale nel melanoma. La presenza della nestina nelle cellule tumorali e nelle cellule dei vasi sanguigni può essere considerata come un potenziale marker precoce di prognosi sia nel melanoma che nel tumore mammario.

BIBLIOGRAFIA

- AIRTUM, Associazione Italiana Registri Tumori, 2009.
- Aitchison TC, Sirel JM, Watt DC, MacKie RM. Prognostic trees to aid prognosis in patients with cutaneous malignant melanoma. Scottish Melanoma Group BMJ, 1995; 311:1536–9.
- Alison MR, Lim SM, Nicholson LJ. Cancer stem cells: problems for therapy? J Pathol. 2011;223(2):147–161.
- Al-Saad S, Al-Shibli K, Donnem T, Persson M, Bremnes RM, Busund LT. The prognostic impact of NF-kappaB p105, vimentin, E-cadherin and Par6 expression in epithelial and stromal compartment in non-small-cell lung cancer. Br. J. Cancer 2008; 99; 1476–1483.
- Almeida OF, Conde´ GL, Crochemore C *et al.* Subtle shifts in the ratio between pro- and anti-apoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. FASEB J. 2000; 14; 779–790.
- Allred DC, Clark GM, Elledge R, Fuqua SWA, Brown RW, Chamness GC, Osborne CK, McGuire WL. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. J Natl Cancer Inst, 1993; 85: 200-206.
- Anderson BO, Yip CH, Smith RA, Shyyan R, Sener SF, Eniu A, Carlson RW, Azavedo E, Harford J. Guideline implementation for breast

- healthcare in low-income and middle-income countries: overview of the Breast Health Global Initiative Global Summit 2007. *Cancer*, 2008. 15;113(8 Suppl):2221-43.
- Balch CM, Soong SJ, Atkins MB, Buzaid AC, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. An evidence-based staging system for cutaneous melanoma. *CA Cancer J Clin*, 2004; 54:131-49.
 - Balch CM, Soong SJ, Murad TM, Ingalls AL, Maddox WA. A multifactorial analysis of melanoma. II. Prognostic factors in patients with stage I (localized) melanoma. *Surgery*, 1979; 86:343–51.
 - Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging System. *J Clin Oncol*, 2001a; 19: 3622-34.
 - Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson

- JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*, 2001b; 19(16):3635-48.
- Balch CM. *Cutaneous melanoma*. In Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M, eds. *AJCC cancer staging manual*, 6th edn. New York: Springer Verlag, 2002; 209-17.
 - Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, *et al.* Melanoma of the skin. In: Edge SE, Byrd DR, Carducci MA, *et al.* (eds) *AJCC Cancer Staging Manual* 7th ed. Springer, 2009; New York: 325–44.
 - Banciu M, Metselaar JM, Schiffelers RM, Storm G. Liposomal glucocorticoids as tumor-targeted anti-angiogenic nanomedicine in B16 melanoma-bearing mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2008; 111; 101–110.
 - Barnhill RL, Lugassy C. Angiotropic malignant melanoma and extravascular migratory metastasis: description of 36 cases with emphasis on a new mechanism of tumour spread. *Pathology*, 2004; 36:485–90.
 - Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc. Natl. Acad. Sc.i U S A* 1987; 84: 2302–6.

- Bataille V (2003) Genetic epidemiology of melanoma. *Eur J Cancer*; 39:1341-7.
- Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, Charafe-Jauffret E, Nasser V, Lloriod B, *et al.* Gene expression profiling for molecular characterization of inflammatory breast cancer and prediction of response to chemotherapy. *Cancer Res* 2004;64:8558-65.
- Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D, Viens P. Gene expression profiling of inflammatory breast cancer. *Cancer* 2010;116:2783-93.
- Borgstein PJ, Meijer S, Van Diest PJ. Are locoregional cutaneous metastases in melanoma predictable? *Ann Surg Oncol*, 1999; 6:315–21.
- Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer statistics. *Bol Asoc Med PR* 1991; 83:225-42.
- Bouamrani A, Ramus C, Gay E *et al.* Increased phosphorylation of vimentin in noninfiltrative meningiomas. *PLoS ONE* 2010; 5; e9238.
- Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*, 1970; 172:902–8.
- Brychtova S, Fiuraskova M, Hlobilkova´ A, Brychta T, Hirnak J. Nestin expression in cutaneous melanomas and melanocytic nevi. *J. Cutan. Pathol.* 2007; 34; 370–375.

- Burkitt HG, Young B, Heath JW. *Weather's Functional Histology*, Churchill Livingstone, London, 1993.
- Buse P, Woo PL, Alexander DB *et al.* Transforming growth factor-alpha abrogates glucocorticoid-stimulated tight junction formation and growth suppression in rat mammary epithelial tumor cells. *J. Biol. Chem.* 1995; 270; 6505–6514.
- Chang CC, Shieh GS, Wu P, Lin CC, Shiau AL *et al.* Oct-3/4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells. *Cancer Res.* 2008;68:6281–91.
- Chou YH, Khuon S, Herrmann H, Goldman RD. Nestin promotes the phosphorylation dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis. *Mol Biol Cell* 2003;14:1468-78.
- Chu YW, Seftor EA, Romer LH, Hendrix MJ. Experimental coexpression of vimentin and keratin intermediate filaments in human melanoma cells augments motility. *Am. J. Pathol.* 1996; 148; 63–69.
- Clark WH Jr. A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biologic behavior In: Montagna W, Hu F, eds. *Advances in the biology of the skin*, Vol. VIII, 1967. New York: Pergamon Press: 621–47.

- Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst*, 1989; 81:1893–904.
- Clark GM, Mathieu MC, Owens MA, *et al.* Prognostic significance of Sphase fraction in goodrisk, nodenegative breast cancer patients. *J Clin Oncol*, 1992;10: 428-432.
- Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell*. 2006; 124(6):1111–1115.
- Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*, 1996; 77:1303–10.
- Cobaleda C, Gutierrez-Cianca N, P ´ erez-Losada J, *et al.* A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2000;95(3):1007–1013.
- Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, Baili P, Rachet B, Gatta G, Hakulinen T, Micheli A, Sant M, Weir HK, Elwood JM, Tsukuma H, Koifman S, E Silva GA, Francisci S, Santaquilani M, Verdecchia A, Storm HH, Young JL; CONCORD

- Working Group. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study. *Lancet Oncol*, 2008; 9(8):730-56.
- Collinson FJ, Lam TK, Bruijn WM *et al.* Long-term survival and occasional regression of distant melanoma metastases after adrenal metastasectomy. *Ann. Surg. Oncol.* 2008; 15; 1741–1749.
 - Conway AE, Lindgren A, Galic Z, *et al.* A self-renewal program controls the expansion of genetically unstable cancer stem cells in pluripotent stem cell-derived tumors. *Stem Cells.* 2009;27(1):18–28.
 - Cook MG. The significance of inflammation and regression in melanoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1992; 420:113–5.
 - Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM *et al.* HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* 2006; 20: 557–70.
 - Cummins DL, Cummins JM, Pantle H, Silverman MA, Leonard AL, Chanmugam A. Cutaneous Malignant Melanoma. *Mayo Clin Proc* 2006; 81(4):500-7.
 - Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*, 2005; 353(20):2135-47.

- Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M; Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*, 2005; 366(9499):1784-93.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 2002; 417(6892):949-54.
- Day CL Jr, Harrist TJ, Gorstein F, Sober AJ, Lew RA, Friedman RJ, Pasternack BS, Kopf AW, Fitzpatrick TB, Mihm MC Jr. Malignant melanoma. Prognostic significance of “microscopic satellites” in the reticular dermis and subcutaneous fat. *Ann Surg*, 1981; 194:108–12.

- Dickman PW, Hakulinen T, Luostarinen T, Pukkala E, Sankila R, Söderman B, Teppo L. Survival of cancer patients in Finland 1955-1994. *Acta Oncol*, 1999; 38 Suppl 12:1-103.
- Dobos J, Kenessey I, Timar J, Ladanyi A. Glucocorticoid receptor expression and antiproliferative effect of dexamethasone on human melanoma cells. *Pathol. Oncol. Res.* 2011; 17; 729–734.
- Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF *et al.* In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* 2003; 17: 1253–70.
- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. Breast. In: *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed., pp 347-76. New York, Springer, 2010.
- Ehrmann J, Kolar Z, Mokry J. Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours. *J Clin Pathol* 2005;58:222-3.
- Elder DE, Gimotty PA, Guerry D. Cutaneous melanoma: estimating survival and recurrence risk based on histopathologic features. *Dermatol Ther*, 2005; 18(5):369-85.
- Elwood JM, Jopson J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer*, 1997; 73:198-203.

- Fusi A, Reichelt U, Busse A *et al.* Expression of the stem cell markers nestin and CD133 on circulating melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 2011; 131; 487–494.
- Fuyuhiko Y, Yashiro M, Noda S *et al.* Clinical significance of vimentin-positive gastric cancer cells. *Anticancer Res.* 2010; 30; 5239–5243.
- Gilles C, Polette M, Mestdagt M *et al.* Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 2003; 63; 2658–2664.
- Goldstein and Tucker. *A Piece of the Melanoma Puzzle Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 97, No. 20, 1486-7; 2005.
- Grichnik JM, Burch JA, Schulteis RD *et al.* Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell? *J. Invest. Dermatol.* 2006; 126; 142–153.
- Grimshaw MJ, Cooper L, Papazisis K, Coleman JA, Bohnenkamp HR *et al.* Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2008; 10:R52.
- Haluska FG. Genetic alterations in melanoma; implications for therapy. *Scientific Symposium. Proc. ASCO 2006.*
- Haluska FG, Tsao H, Wu H, Haluska FS, Lazar A, Goel V. Genetic alterations in signaling pathways in melanoma. *Clin Cancer Res*, 2006; 12(7 Pt 2):2301s-2307s.

- Hatina J, Schulz WA Cancer stem cells – basic concepts. In: Encyclopedia of Life Sciences. Chichester: John Wiley & Sons, 2008.
- Hayes DF. Prognostic and predictive factors revisited. *Breast* 2005;14:493-9.
- Hayward JL, Carbone PP, Heusen JC, Kumaoka S, Segaloff A, Rubens RD. Assessment of response to therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1977;35:292-8.
- Henriksen T, Dahlback A, Larsen SH, Moan J. Ultraviolet-radiation and skin cancer: effect of an ozone layer depletion. *Photochem Photobiol*, 1990; 51:579-82.
- Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW *et al.* Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 313–23.
- Holly EA, Aston DA, Cress RD, Ahn DK, Kristiansen JJ. Cutaneous melanoma in women, I: exposure to sunlight, ability to tan, and other risk factors related to ultraviolet light. *Am J Epidemiol*, 1995; 141:923-33.
- Horii R, Akiyama F, Ito Y, Iwase T. Assessment of hormone receptor status in breast cancer. *Pathol Int* 2007;57:784-90.

- IARC. *Breast cancer screening*, IARC handbooks for cancer prevention, volume 7, Lyon, International Agency for Research on Cancer, IARCpress, 2002.
- IARC (2008). *World cancer report 2008*. Lyon, International Agency for Research on Cancer.
- Ionta MT, Perra MT, Atzori F, Maxia C, Pusceddu V, Demurtas P, et al. Long-term maintenance of prognostic value of survivin and its relationship with p53 in T4 breast cancer patients. *Exp Ther Med* 2010;1:59-64.
- Ishiwata T, Matsuda Y, Naito Z. Nestin in gastrointestinal and other cancers: effects on cells and tumor angiogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2011; 17; 409–418.
- Jin H, Morohashi S, Sato F *et al.* Vimentin expression of esophageal squamous cell carcinoma and its aggressive potential for lymph node metastasis. *Biomed. Res.* 2010; 31; 105–112.
- Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, McClure M, Aitken JF, Anderson DE, Bergman W, Frants R, Goldgar DE, Green A, MacLennan R, Martin NG, Meyer LJ, Youl P, Zone JJ, Skolnick MH & Cannon-Albright LA. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet*, 1994; 8(1):23-6.

- Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, Nosrati M, Miller JR III. Vascular involvement in the prognosis of primary cutaneous melanoma. *Arch Dermatol*, 2001; 137:1169–73.
- Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, Nosrati M, Miller JR III. Tumor vascularity in the prognostic assessment of primary cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*, 2002; 20:1826–31.
- Kawamoto M, Ishiwata T, Cho K, Uchida E, Korc M, Naito Z, *et al.* Nestin expression correlates with nerve and retroperitoneal tissue invasion in pancreatic cancer. *Hum Pathol* 2009;40:189-98.
- Kleeberger W, Bova GS, Nielsen ME, Herawi M, Chuang AY, Epstein JI, *et al.* Roles for the stem cell associated intermediate filament Nestin in prostate cancer migration and metastasis. *Cancer Res* 2007;67:9199-206.
- Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M. Vimentin and epithelial–mesenchymal transition in human breast cancer-observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs* 2007; 185; 191–203.
- Korsching E, Packeisen J, Liedtke C *et al.* The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial–mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J. Pathol.* 2005; 206; 451–457.

- Lacey JV Jr, Kreimer AR, Buys SS, Marcus PM, Chang SC, Leitzmann MF, Hoover RN, Prorok PC, Berg CD, Hartge P; Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening; Trial Project Team. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer*, 2009; 9, 84.
- Lang SH, Hyde C, Reid IN *et al.* Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *Prostate* 2002; 52; 253–263.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990;60:585-95.
- Lew RA, Sober AJ, Cook N, Marvell R, Fitzpatrick TB. Sun exposure habits in patients with cutaneous melanoma: a case control study. *J Dermatol Surg Oncol*, 1983; 9:981-6.
- Li H, Chen X, Calhoun-Davis T, Claypool K, Tang DG. PC3 human prostate carcinoma cell holoclones contain self-renewing tumor-initiating cells. *Cancer Res.* 2008; 68: 1820–5.
- Li H, Cherukuri P, Li N, Cowling V, Spinella M, Cole M, *et al.* Nestin is expressed in the basal/myoepithelial layer of the mammary gland and is a

- selective marker of basal epithelial breast tumors. *Cancer Res* 2007;67:501-10.
- Li M, Zhang B, Sun B *et al.* A novel function for vimentin: the potential biomarker for predicting melanoma hematogenous metastasis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2010; 29; 109.
 - Liu C, Chen B, Zhu J, Zhang R, Yao F, Jin F, *et al.* Clinical implications for nestin protein expression in breast cancer. *Cancer Sci* 2010;10:815-9.
 - Liu J, Brown RE. Immunohistochemical detection of epithelial-mesenchymal transition associated with stemness phenotype in anaplastic thyroid carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2010; 8; 755–762.
 - Locke M, Heywood M, Fawell S, MacKenzie IC. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res.* 2005; 65: 8944–50.
 - Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, Ono T, Albertson DG, Pinkel D, Bastian BC. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst*, 2003; 95(24):1878-90.
 - Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133: 704–15.

- Martignone S, Menard S, Bufalino R, Cascinelli N, Pellegrini R, Tagliabue E, Andreola S, Rilke E, Coinaghi MI. Prognostic significance of the 67 kilodalton laminin receptor expression in human breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst*, 1993; 85: 398-402.
- Massidda B, Sini M, Budroni M, Atzori F, Deidda M, Pusceddu V, *et al.* Molecular alterations in key-regulator genes among patients with T4 breast carcinoma. *BMC Cancer* 2010;10:458.
- McGuire WL, Tandon AK, Allred DC, Chamness GC, Ravdin PM, Clark GM Prognosis and treatment decisions in patients with breast cancer without axillary node involvement. *Cancer*, 1992; 70: 1775-1781.
- Mihm MC Jr, Clemente CG, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest*, 1996; 74:43–7.
- Mikesch LM, Kumar M, Erdag G *et al.* Evaluation of molecular markers of mesenchymal phenotype in melanoma. *Melanoma Res.* 2010; 20; 485–495.
- Miller AL, Komak S, Webb MS, Leiter EH, Thompson EB. Gene expression profiling of leukemic cells and primary thymocytes predicts a

- signature for apoptotic sensitivity to glucocorticoids. *Cancer Cell Int.* 2007; 7; 18.
- Mokřý J, Cízková D, Filip S, Ehrmann J, Osterreicher J, Kolár Z, *et al.* Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev* 2004;13:658-64.
 - Mokřý J, Cízková D, Ehrmann J, Stanislav F, Kolár Z. Expression of intermediate filament nestin in vascular endothelium. *Folia Histochem Cyto* 2008;46:90.
 - Newton R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* 2000; 7; 603–613.
 - Nowell The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23–8).
 - Ocana OH, Nieto MA. Epithelial plasticity, stemness and pluripotency. *Cell Res.* 2010; 20: 1086–8.
 - Oliveria SA, Saraiya M, Geller AC, Heneghan MK and Jorgensen C. Sun exposure and risk of melanoma. *Arch Dis Child*, 2006; 91:131–8.
 - Osterlind A, Tucker MA, Stone BJ, Jensen OM. The Danish case-control study of cutaneous malignant melanoma, II: importance of UV-light exposure. *Int J Cancer*, 1988; 42:319-24.

- Parry S, Savage K, Marchiò C, Reis-Filho JS. Nestin is expressed in basal-like and triple negative breast cancers. *J Clin Pathol* 2008;61:1045-50.
- Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(suppl 1):11842–11849. doi:10.1073/pnas.2034201100
- Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*, 2001; 411(6835):390-5. Review.
- Pietras K, Ostman A Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp. Cell Res.* 2010; 316: 1324–31.
- Piras F, Perra MT, Murtas D *et al.* The stem cell marker nestin predicts poor prognosis in human melanoma. *Oncol. Rep.* 2010; 23; 17–24.
- Piras F, Ionta MT, Lai S *et al.* Nestin expression associates with poor prognosis and triple negative phenotype in locally advanced (T4) breast cancer. *Eur. J. Histochem.* 2011; 55; 215–220.
- Podberezin M, Wen J, Chang CC *Cancer Stem Cells: A Review of Potential Clinical Applications* 2012
- Qin Q, Sun Y, Fei M *et al.* Expression of putative stem marker nestin and CD133 in advanced serous ovarian cancer. *Neoplasma* 2012; 59; 310–316.

- Ramalingam A, Hirai A, Thompson EA. Glucocorticoid inhibition of fibroblast proliferation and regulation of the cyclin kinase inhibitor p21Cip1. *Mol. Endocrinol.* 1997; 11; 577–586.
- Reimer R, Helmbold H, Szalay B *et al.* Nestin modulates glucocorticoid receptor function by cytoplasmic anchoring. *PLoS ONE* 2009; 4; e6084.
- Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Mariotto A, Feuer EJ, Edwards BK. SEER Cancer Statistics Review, 1975e2002. Bethesda, MD: National Cancer Institute; http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002/ [based on November 2004 SEER data submission, posted to the SEER web site 2005].
- Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ. Glucocorticoid receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 1997; 17; 3181–3193.
- Rogelsperger O, Ekmekcioglu C, Jager W, Klimpfinger M, Konigsberg R, Krenbek D, *et al.* Coexpression of the melatonin receptor 1 and nestin in human breast cancer specimens. *J Pineal Res* 2009;46:422-32.
- Ronan SG, Han MC, Das Gupta TK. Histologic prognostic indicators in cutaneous malignant melanoma *Semin Oncol*, 1988; 15:558–65.

- Sahlgren CM, Mikhailov A, Hellman J, Chou YH, Lendahl U, Goldman RD, *et al.* Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase. *J Biol Chem* 2001;276:16456-63.
- Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ, Seinige UL, Lieber CP, Baloch Z. Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. *J Am Coll Surg* 1995;180:297-306.
- Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011; 68; 3033–3046.
- Schatton T, Frank MH. Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008; 21; 39–55.
- Schuchter L, Schultz DJ, Synnestvedt M, Trock BJ, Guerry D, Elder DE, Elenitsas R, Clark WH, Halpern AC. A prognostic model for predicting 10-year survival in patients with primary melanoma. The Pigmented Lesion Group *Ann Intern Med*, 1996; 125:369-75.
- Sellheyer K, Krahl D. Does the peritumoral stroma of basal cell carcinoma recapitulate the follicular connective tissue sheath? *J Cutan Pathol* 2011;38:551-9.

- Shaw HM, Balch CM, Soong SJ, Milton GW, McCarthy WH. Prognostic histopathological factors in malignant melanoma. *Pathology*, 1985; 17: 271–4.
- Silvestrini R, Daidone MG, Costa A. Determination of the proliferative fraction in human tumors. In: GP Studzinski (Ed). *Cell Growth and Apoptosis. A Practical Approach*. IRL Oxford University Press, pp. 59-77, 1995.
- Silvestrini R, Daidone MG, Linsi A, Boracchi P, Mezzetti M, Di Fronzo G, Andreola S, Veronesi U. Biologic and clinicopathologic factors as indicators of specific relapse types in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 1995; 13: 697-704.
- Silvestrini R. Cell kinetics: Prognostic and therapeutic implication in human tumors. *Cell Prol*, 1994; 27: 579-596.
- Silvestrini R, Benini E, Daidone MG, Veneroni S, Boracchi P, Cappelletti V, Di Fronzo G, Veronesi U. P53 as an independent prognostic marker in lymph node negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 1993; 85: 965-970.
- Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, Di Fronzo G, Veronesi U. The bcl2 protein: A prognostic indicator

- strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 1994; 86: 499-504.
- Singec I, Knoth R, Meyer RP, Maciaczyk J, Volk B *et al*. Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nature Methods* 2006; 3: 801 – 806.
 - Singh LC, Chakraborty A, Mishra AK, Devi TR, Sugandhi N, Chintamani C, *et al*. Study on predictive role of AR and EGFR family genes with response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer in Indian women. *Med Oncol* 2011 [Epub ahead of print].
 - Singh S, Sadacharan S, Su S, Beldegrun A, Persad S, Singh G. Overexpression of vimentin: role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer. *Cancer Res*. 2003; 63; 2306–2311.
 - Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WI, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science*, 1987; 235: 177-182.
 - Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, International Union against Cancer. *TNM Classification of Malignant Tumors*, 7th ed. Hoboken, Wiley-Blackwell, 2009.

- Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 2003; 22; 3138–3151.
- Son GH, Geum D, Jung H, Kim K. Glucocorticoid inhibits growth factor-induced differentiation of hippocampal progenitor HiB5 cells. *J. Neurochem.* 2001; 79; 1013–1021.
- Sousa N, Paula-Barbosa MM, Almeida OF. Ligand and subfield specificity of corticoid-induced neuronal loss in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 1999; 89; 1079–1087.
- Strojnik T, Røsland GV, Sakariassen PO, Kavalar R, Lah T. Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival. *Surg. Neurol.* 2007; 68; 133–143.
- Subramaniam DS, Isaacs C. Utilizing prognostic and predictive factors in breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2005;6:147-59.
- Takemura K, Hirayama R, Hirokawa K *et al.* Expression of vimentin in gastric cancer: a possible indicator for prognosis. *Pathobiology* 1994; 62; 149–154.
- Tan L, Sui X, Deng H, Ding M. Holoclone forming cells from pancreatic cancer cells enrich tumor initiating cells and represent a novel model for study of cancer stem cells. *PLoS One* 2011; 6:e23383.

- Tanabe K, Amoh Y, Kanoh M *et al.* Prognostic significance of the hair follicle stem cell marker nestin in patients with malignant melanoma. *Eur. J. Dermatol.* 2010; 20; 283–288.
- Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. HER2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol*, 1989; 7: 1120-1128.
- Teranishi N, Naito Z, Ishiwata T, Tanaka N, Furukawa K, Seya T, *et al.* Identification of neovasculature using nestin in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2007;30:593-603.
- Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2; 442–454.
- Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol* 2006;1:119.
- Trog D, Yeghiazaryan K, Schild HH, Golubnitschaja O. Upregulation of vimentin expression in low-density malignant glioma cells as immediate and late effects under irradiation and temozolomide treatment. *Amino Acids* 2008; 34; 539–545.
- Tsao H, Zhang X, Fowlkes K, Haluska FG. Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines. *Cancer Res*, 2000; 60(7):1800-4.

- Tsujimura T, Makiishi-Shimobayashi C, Lundkvist J *et al.* Expression of the intermediate filament nestin in gastrointestinal stromal tumors and interstitial cells of Cajal. *Am. J. Pathol.* 2001; 158; 817–823.
- Tuthill RJ, Unger JM, Liu PY, Flaherty LE, Sondak VK. Risk assessment in localized primary cutaneous melanoma: a Southwest Oncology Group study evaluating nine factors and a test of the Clark logistic regression prediction model. *Am J Clin Pathol*, 2002; 4:504–11.
- Upton MP, Hirohashi S, Tome Y, Miyazawa N, Suemasu K, Shimosato Y. Expression of vimentin in surgically resected adenocarcinomas and large cell carcinomas of lung. *Am. J. Surg. Pathol.* 1986; 10; 560–567.
- Van der Auwera I, Van Laere SJ, Van denEynden GG, Benoy I, van Dam P, Colpaert CG, *et al.* Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus noninflammatory breast cancer by realtime reverse transcriptase-PCR gene expression quantification. *Clin Cancer Res* 2004;10:7965-71.
- Van Laere S, Van der Auwera I, Van den Eynden G, Van Hummelen P, Van Dam P, Van Marck E, *et al.* Distinct molecular phenotype of inflammatory breast cancer compared to non-inflammatory breast cancer using Affymetrix-based genome-wide gene-expression analysis. *Br J Cancer* 2007;97:1165-74.

- Veselska R, Hermanova M, Loja T *et al.* Nestin expression in osteosarcomas and derivation of nestin/CD133 positive osteosarcoma cell lines. *BMC Cancer* 2008; 8; 300.
- Wang JC, Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol.* 2005;15(9):494–501.
- Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F *et al.* The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat. Cell Biol.* 2009; 11: 1487–95.
- West RB, van de Rijn M. Experimental approaches to the study of cancer-stroma interactions: recent findings suggest a pivotal role for stroma in carcinogenesis. *Lab Invest* 2007;87:967.
- Whiteman D, Green A. Melanoma and sunburn. *Cancer Causes Control*, 1994; 5:564-572.
- WHO. *Cancer control: knowledge into action: WHO guide for effective programmes: early detection*, 2007.
- WHO. *The global burden of disease: 2004 update*, 2008.
- WHO, 2005.
- Woodward WA, Strom EA, Tucker SL, McNeese MD, Perkins GH, Schechter Nr, *et al.* Changes in the 2003 American Joint Committee on

- Cancer staging for breast cancer dramatically affect stage-specific survival. *J Clin Oncol* 2003;21:3244-8.
- Wu KJ, Yang MH. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness: the Twist1-Bmi1 connection. *Biosci. Rep.* 2011; 31: 449–55.
 - Xiao Y, Ye Y, Yearsley K, Jones S, Barsky SH. The lymphovascular embolus of inflammatory breast cancer expresses a stem cell-like phenotype. *Am J Pathol* 2008;173: 561-4.
 - Yamada H, Takano T, Ito Y *et al.* Expression of nestin mRNA is a differentiation marker in thyroid tumors. *Cancer Lett.* 2009; 280; 61–64.
 - Yang J, Weinberg RA. Epithelial–mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell* 2008; 14; 818–829.
 - Yang MH, Hsu DS, Wang HW, Wang HJ, Lan HY *et al.* Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* 2010; 12: 982–92.
 - Yang XH, Wu QL, Yu XB, Xu CX, Ma BF, Zhang XM, *et al.* Nestin expression in different tumours and its relevance to malignant grade. *J Clin Pathol* 2008;61:467-73.
 - Yip CH, Smith RA, Anderson BO, Miller AB, Thomas DB, Ang ES, Caffarella RS, Corbex M, Kreps GL, McTiernan A; Breast Health Global

- Initiative Early Detection Panel. Guideline implementation for breast healthcare in low- and middle-income countries: early detection resource allocation. *Cancer*. 2008; 13 (8 Suppl):2244-56.
- Zhao Y, Yan Q, Long X, Chen X, Wang Y. Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells. *Cell Biochem. Funct.* 2008; 26; 571–577.
 - Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, *et al.* Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neuron specific stem cells or muscle precursors. *Neuron* 1994;12:11-24.

TABELLE

Tabella 1. Associazione dell'espressione di GR, nestina e vimentina con le caratteristiche clinicopatologiche in 81 pazienti affetti da melanoma

	Totale	GR nucleare n (%)	GR Citoplasm. n (%)	GR Nucleare e Citoplasm. n (%)	*P-value	Nestina n (%)	*P-value	Vimentina n (%)	*P-value
Pazienti	81	30 (37.0)	32 (39.5)	19 (23.5)		59 (72.8)		67 (82.7)	
Genere					0.548		0.452		0.557
Maschi	37	12 (32.4)	17 (46.0)	8 (21.6)		25 (67.6)		32 (86.5)	
Femmine	44	18 (40.9)	15 (34.1)	11 (25.0)		34 (77.3)		35 (79.5)	
Età**					0.559		0.803		0.770
≥ 64	41	13 (31.7)	18 (43.9)	10 (24.4)		29 (72.5)		33 (82.5)	
< 64	40	17 (42.5)	14 (35.0)	9 (22.5)		30 (73.2)		34 (82.9)	
Stadio					0.759		1		1
I, II	48	19 (39.6)	19 (39.6)	10 (20.8)		35 (72.9)		40 (83.3)	
III, IV	33	11 (33.3)	13 (39.5)	9 (27.3)		24 (72.7)		27 (81.8)	
Localizzazione					0.058		0.470		0.664
Testa e collo	20	8 (40.0)	12 (60.0)	0 (0.0)		13 (65.0)		15 (75.0)	
Tronco	20	9 (45.0)	6 (30.0)	5 (25.0)		13 (65.0)		18 (90.0)	
Arti superiori	12	3 (25.0)	6 (50.0)	3 (25.0)		10 (83.3)		10 (83.3)	
Arti inferiori	29	10 (34.5)	8 (27.6)	11 (37.9)		23 (79.3)		24 (82.8)	
Nestina					0.008				0.009
Positivi	59	16 (27.1)	26 (44.1)	17 (28.8)				53 (89.8)	
Negativi	22	14 (63.6)	6 (27.3)	2 (9.1)				14 (63.6)	
Vimentina					0.279				
Positivi	67	24 (35.8)	25 (37.3)	18 (26.9)					
Negativi	14	6 (42.9)	7 (50.0)	1 (7.1)					
Spessore***					0.003		0.144		0.521
T1, T2	22	14 (63.6)	4 (18.2)	4 (18.2)		13 (59.1)		19 (86.4)	
T3, T4	42	9 (21.4)	23 (54.8)	10 (23.8)		33 (78.6)		33 (78.6)	
Livello di Clark***					0.000		0.230		0.739
I, II, III	20	14 (70.0)	2 (10.0)	4 (20.0)		12 (60.0)		17 (85.0)	
IV, V	44	9 (20.5)	25 (56.8)	10 (22.7)		34 (77.3)		35 (79.5)	

*Fisher's exact test e Pearson's test; **Valore medio; ***solo i tumori primari.

Tabella 2. Associazione tra localizzazione sub-cellulare di GR con l'espressione di nestina e vimentina

	Totale	GR Nucleare	GR Citoplasm.	GR Nucleare e citoplasm.	*P-value
		n (%)	n (%)	n (%)	
Pazienti	81	30 (37.0)	32 (39.5)	19 (23.5)	
Nestina					0.008
Vimentina					
positivi	53	14 (26.4)	22 (41.5)	17 (32.1)	
negativi	28	16 (57.1)	10 (35.7)	2 (7.2)	
positivi					
negativi					

*Fisher's exact test.

Tabella 3. Associazione tra la concomitante e non concomitante espressione di nestina, vimentina e GR citoplasmatico con le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti affetti da melanoma.

	Total	Espressione concomitante di nestina, vimentina e GR citoplas.	Espressione non concomitante di nestina, vimentina e GR citoplas.	Espressione concomitante di nestina, vimentina e GR nucleare e citoplas.	*P-value
		n (%)	n (%)	n (%)	
Pazienti	81	22 (27.2)	42 (51.8)	17 (21.0)	
Genere					0.857
Maschi	37	11 (29.7)	19 (51.4)	7 (18.9)	
Femmine	44	11 (25.0)	23 (52.3)	10 (22.7)	
Età**					0.852
≥ 64	41	10 (24.4)	22 (53.7)	9 (21.9)	
< 64	40	12 (30.0)	20 (50.0)	8 (20.0)	
Stadio					0.630
I, II	48	12 (25.0)	27 (56.2)	9 (18.8)	
III, IV	33	10 (30.3)	15 (45.5)	8 (24.2)	
Localizzazione del tumore					0.058
Testa e collo	20	12 (60.0)	8 (40.0)	0 (0.0)	
Tronco	20	6 (30.0)	9 (45.0)	5 (25.0)	
Arti superiori	12	6 (50.0)	3 (25.0)	3 (25.0)	
Arti inferiori	29	8 (27.6)	10 (34.5)	11 (37.9)	
Spessore***					0.029
T1+T2	22	3 (13.6)	16 (72.7)	3 (13.6)	
T3+T4	42	16 (38.1)	16 (38.1)	10 (23.8)	
Livello di Clark***					0.020
I, II, III	20	2 (10.0)	15 (75.0)	3 (15.0)	
IV, V	44	17 (38.6)	17 (38.6)	10 (22.7)	

*Pearson test; **Valore medio; ***Solo tumori primari.

Tabella 4. Valori di sopravvivenza a 5 anni per l'espressione concomitante e non concomitante di nestina, vimentina e GR citoplasmatico in pazienti con melanoma cutaneo di Stadio I, II e Stadio III, IV

	Pazienti	Eventi	Censurati (%)	% 5 anni soprav. (SE)	*P-value
Stadio I e II	48	8	40 (83.3)		0.513
Concomitante nestina, vimentina e GR citoplasmatico	12	2	10 (83.3)	74.1 (16.1)	
Non concomitante nestina, vimentina e GR citoplasmatico	27	6	21 (77.8)	78.8 (9.5)	
Concomitante nestina, vimentina e GR citoplasmatico e nucleare	9	0	9 (100)	100 (-)	
Stadio III e IV	33	28	5 (15.2)		0.020
Concomitante nestina, vimentina e GR citoplasmatico	10	10	0 (0)	0	
Non concomitante nestina, vimentina e GR citoplasmatico	15	10	5 (33.3)	25 (13.4)	
Concomitante nestina, vimentina e GR citoplasmatico e nucleare	8	8	0 (0)	0	
Totale	81	36	45 (55.6)		

SE, standard error; *Log-rank test.

Tabella 5. Caratteristiche del tumore e variabili cliniche: associazione con l'espressione della nestina e con la sopravvivenza globale

	N. pazienti	Nestina	P*	N. eventi	P**
Età			0.276		0.541
≤51***	25	11		15	
>51	28	17		15	
Stadio del tumore			0.016		0.455
T4abc	38	16		21	
T4d	15	12		9	
Linfonodi ascellari****			1.000		0.029
cLN 0	12	6		3	
cLN +	41	22		27	
Triple negative			0.002		0.039
Si	18	15		13	
No	35	13		17	
Status dei recettori ormonali			0.029		0.140
ER - PR-	24	17		16	
ER - PR +	1	1		0	
ER + PR -	12	6		6	
ER + PR +	16	4		8	
estrogenici			0.013		0.075
ER+	28	10		14	
ER -	25	18		16	
Status dei recettori progestinici			0.037		0.079
PR +	17	5		8	
PR -	36	23		22	
Status di HER2			0.162		0.635
HER2 +	10	3		5	
HER2 -	43	25		25	
Grado			0.360		0.461
G2	38	22		23	
G3	15	6		7	
Risposta patologica			0.255		0.087
pCR	8	5		2	
<pCR	45	23		28	
Risposta clinica			0.256		0.043
Risposta completa	8	4		2	
Risposta parziale	36	17		20	
< Risposta parziale	9	7		8	

*Fisher's exact test o Pearson's test; ** log-rank test; *** età media; **** dopo chemoterapia primaria.

Tabella 6. Valori di sopravvivenza valutati a 5 e 10 anni per pazienti con tumore T4 con differente espressione della nestina

	Pazienti	Eventi a 5 anni	% 5 anni di sopravvivenza (SE)	<i>P</i>*	Eventi a 10 anni	% 10 anni di sopravvivenza (SE)	<i>P</i>*
Nestina				0.02			0.05
Casi negativi	25	6	76.0 (8.5)		10	51.0 (12.8)	
Casi positivi	28	15	46.4 (9.4)		19	28.1 (9.4)	

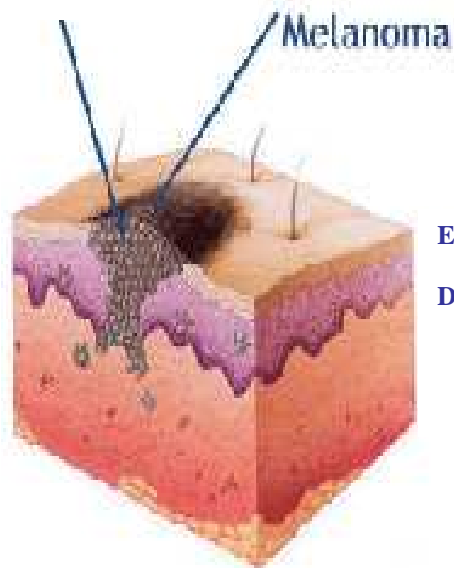
*Log-rank-test.

ICONOGRAFIA



Fig. 1. Il melanoma a diffusione superficiale (A) e il melanoma nodulare (B) rappresentano gli istotipi più frequenti di melanoma.

Melanociti



Melanoma

Epidermide

Derma

Livelli di profondità



Fig. 2. Il melanoma, a seconda dell'istotipo, può presentare una fase iniziale con diffusione “piana” sulla superficie cutanea, che rappresenta la fase di crescita orizzontale (melanoma piano). Dopo un periodo di tempo variabile, il tumore può sviluppare una componente nodulare invasiva (melanoma piano-cupoliforme). Invece il melanoma nodulare, fin dal primo momento, è un nodulo invasivo in profondità (melanoma cupoliforme).

Sistema di Stadiazione del melanoma cutaneo secondo l'AJCC			
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
IIA	T2a	N0	M0
	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1-4a	N1a	M0
	T1-4a	N2a	M0
IIIB	T1-4b	N1a	M0
	T1-4b	N2a	M0
	T1-4a	N1b	M0
	T1-4a	N2b	M0
	T1-4a	N2c	M0
	T1-4b	N2c	M0
	T1-4b	N1b	M0
IIIC	T1-4b	N2b	M0
	Any T	N3	M0
IV	Any T	Any N	Any M

Fig. 3. Il nuovo sistema di stadiazione dell'American Joint Committee on Cancer (AJCC) contempla fattori legati al tumore primario, come lo spessore del tumore (T) e l'ulcerazione (assenza, a; presenza, b), la presenza e il numero di metastasi linfonodali (N), la presenza e la sede di metastasi a distanza (M).

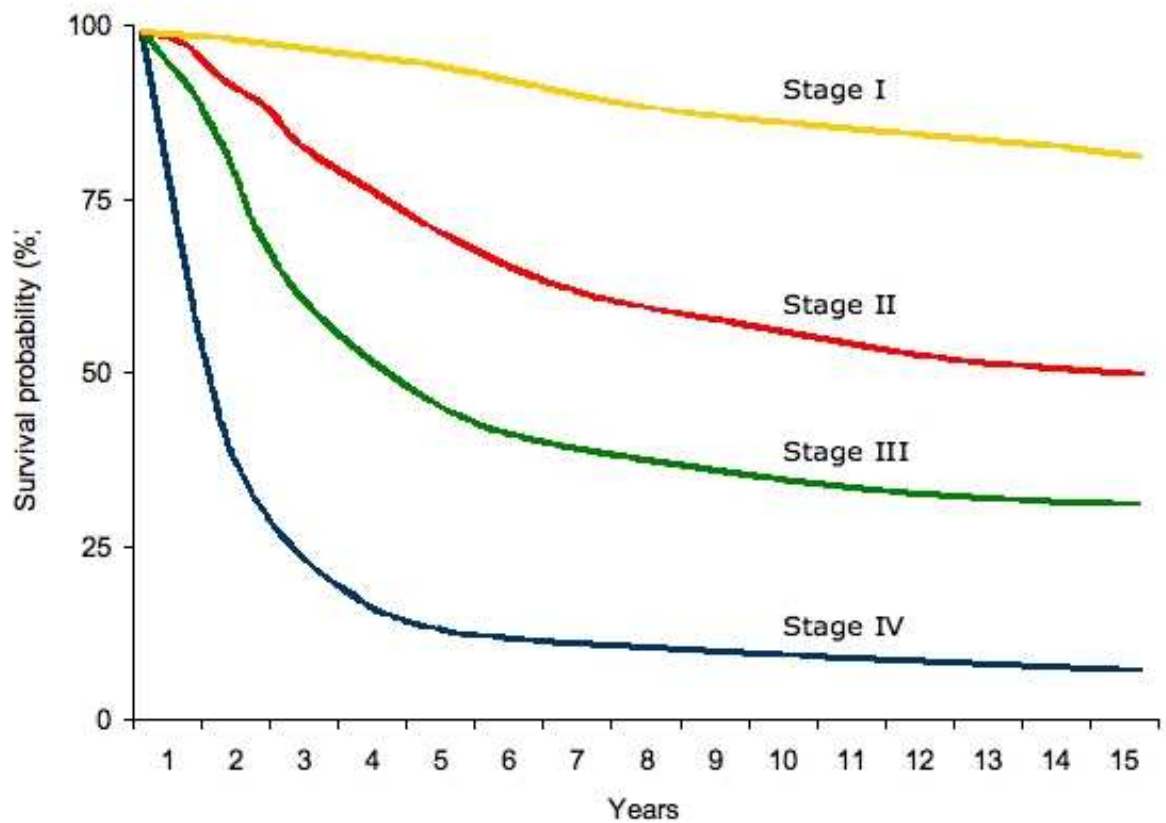


Fig. 4. Analisi del tempo di sopravvivenza di pazienti con melanomi di Stadio I e II, con metastasi regionali (Stadio III) e metastasi a distanza (Stadio IV). Le differenze tra le curve di sopravvivenza erano altamente significative ($P < 0.0001$).

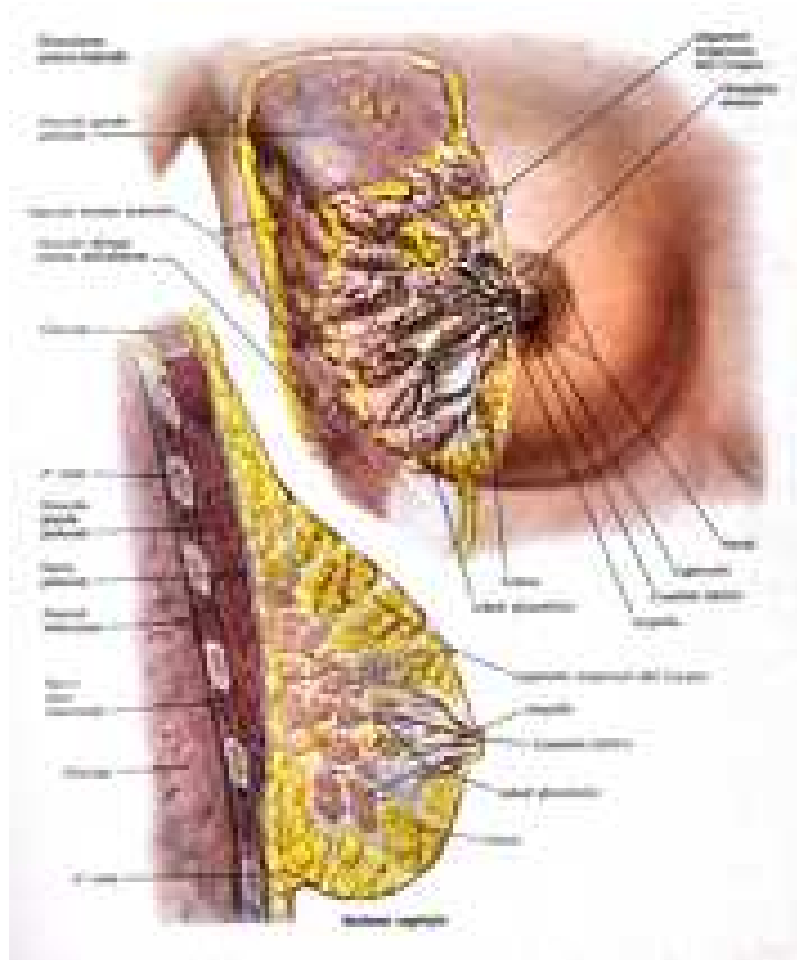


Fig. 5. Struttura della ghiandola mammaria.

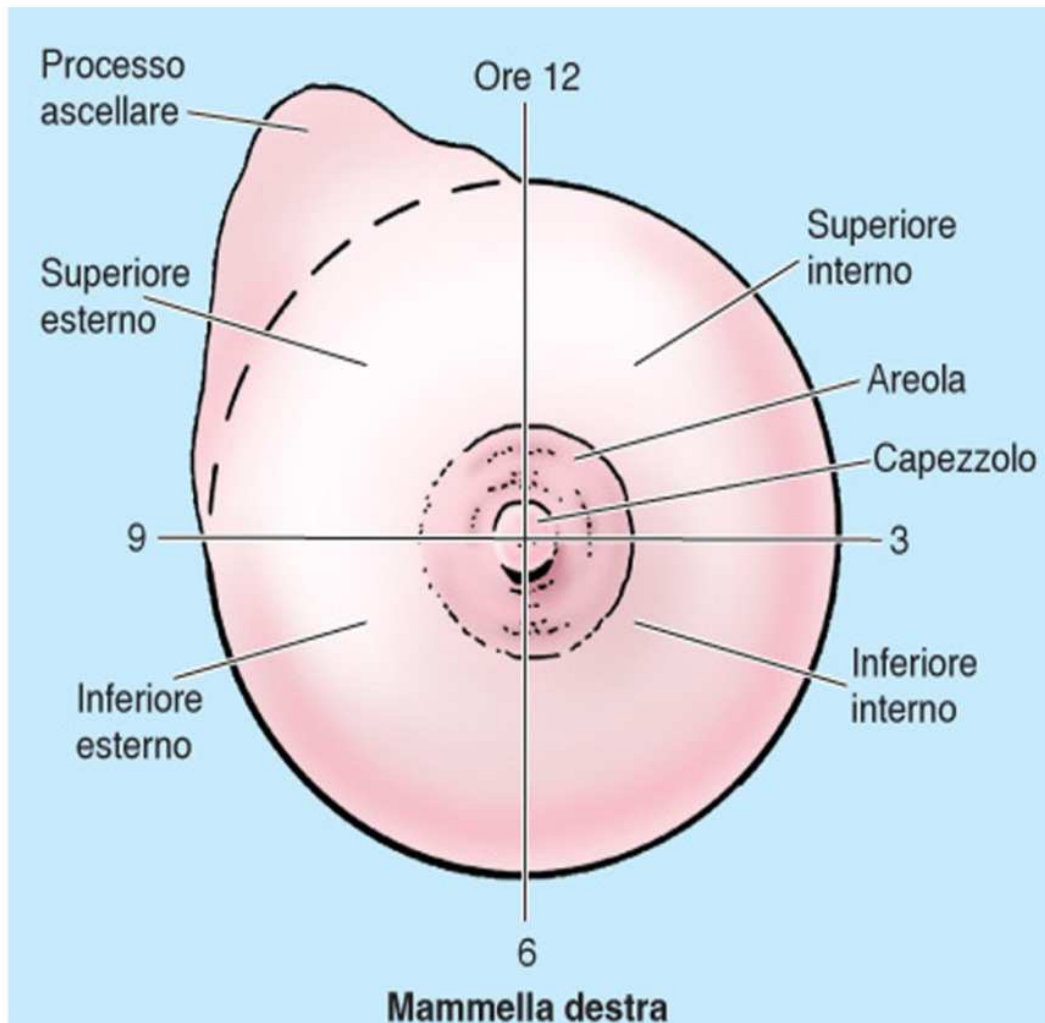


Fig. 6. Coordinate spaziali della ghiandola mammaria.

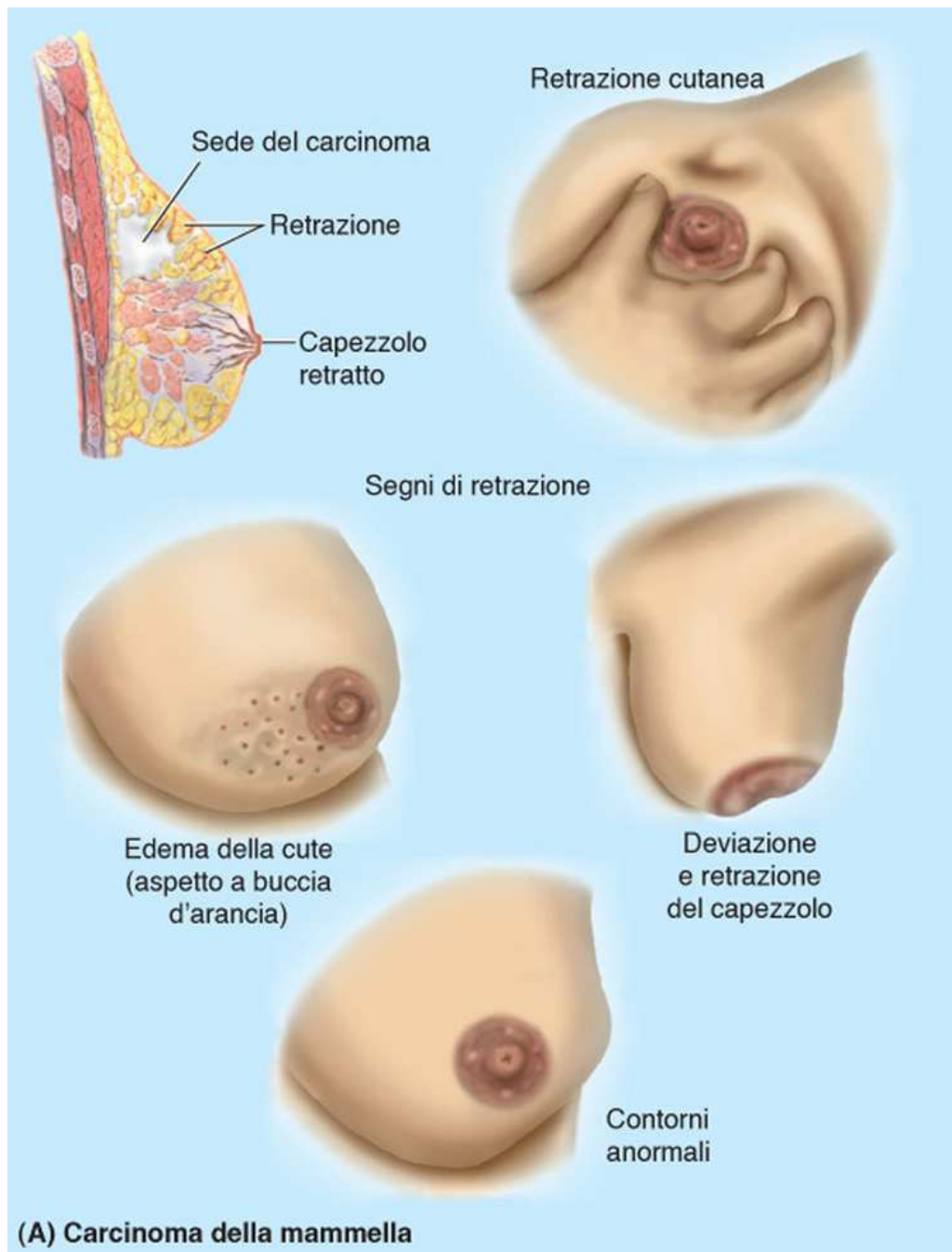
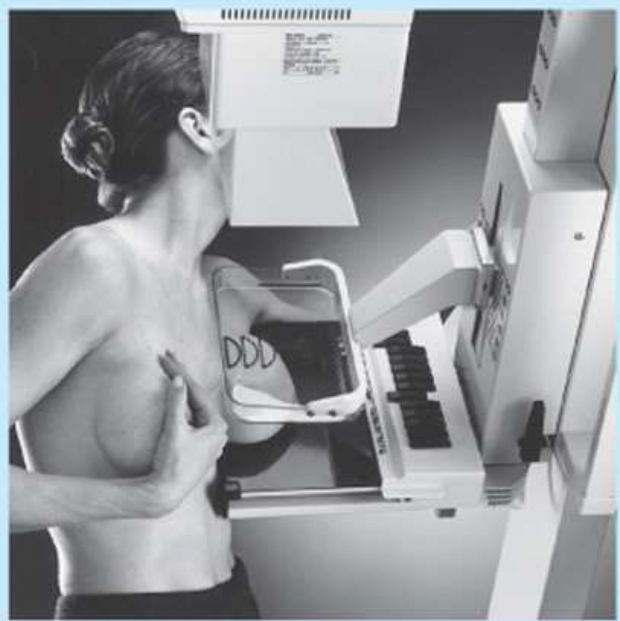
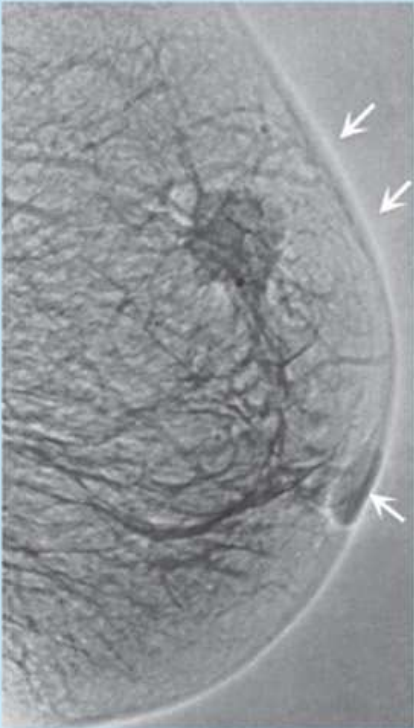


Fig. 7. Aspetto esterno della ghiandola mammaria affetta da carcinoma.



(B) Mammografia



(C) Mammogramma

Fig. 8. Esame mammografico.

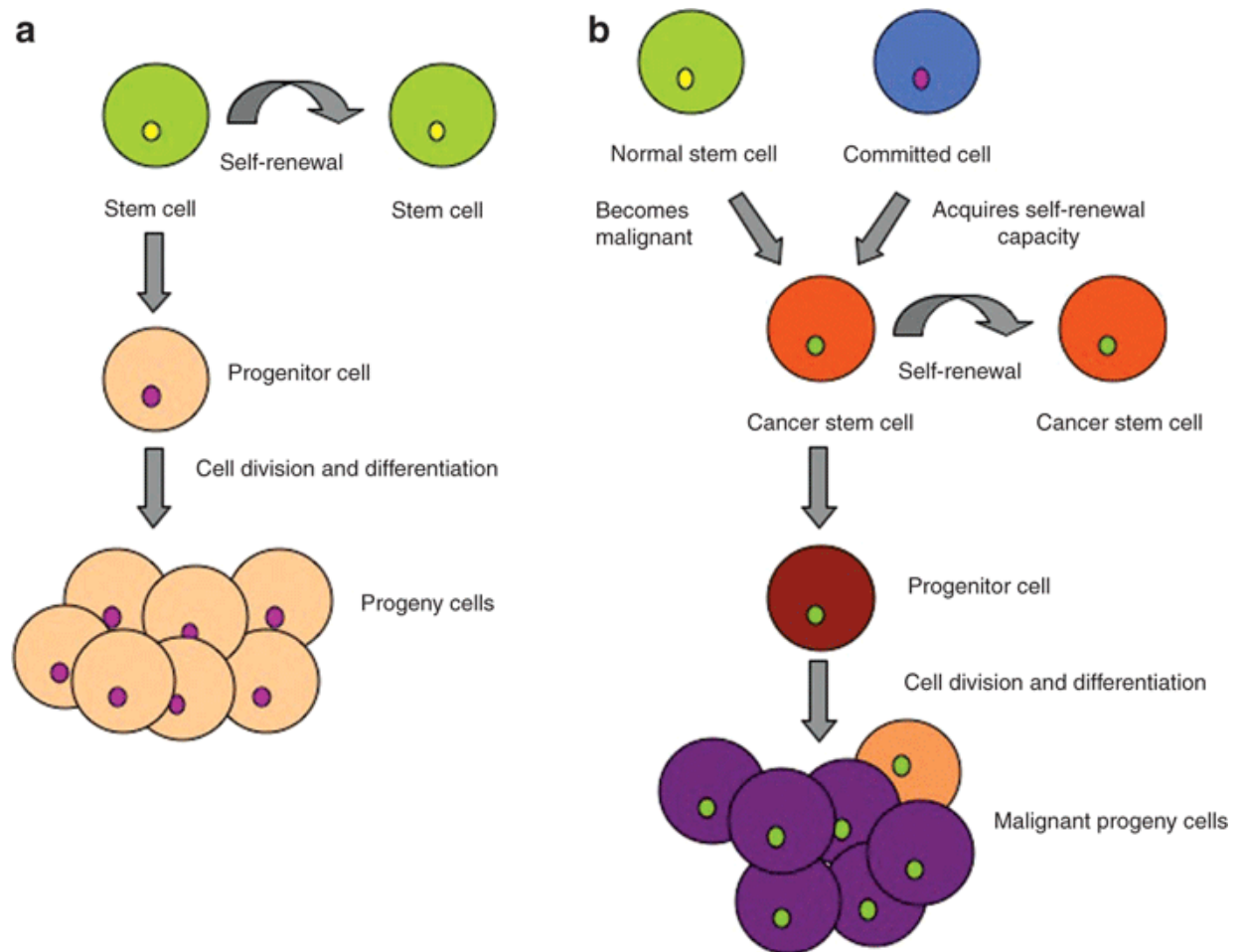


Fig. 9. Progressione tumorale secondo divisione asimmetrica nelle cellule staminali. (a) Divisione asimmetrica nelle normali cellule staminali. Una cellula staminale è in grado di auto-rinnovarsi per dare origine a un'altra cellula staminale (verde) e a una cellula progenitrice (rosa). (b) Divisione asimmetrica nelle cellule staminali del cancro CSCs. Una CSC (arancione) può dare origine a un'altra CSC o dare origine a una cellula progenitrice (marrone).

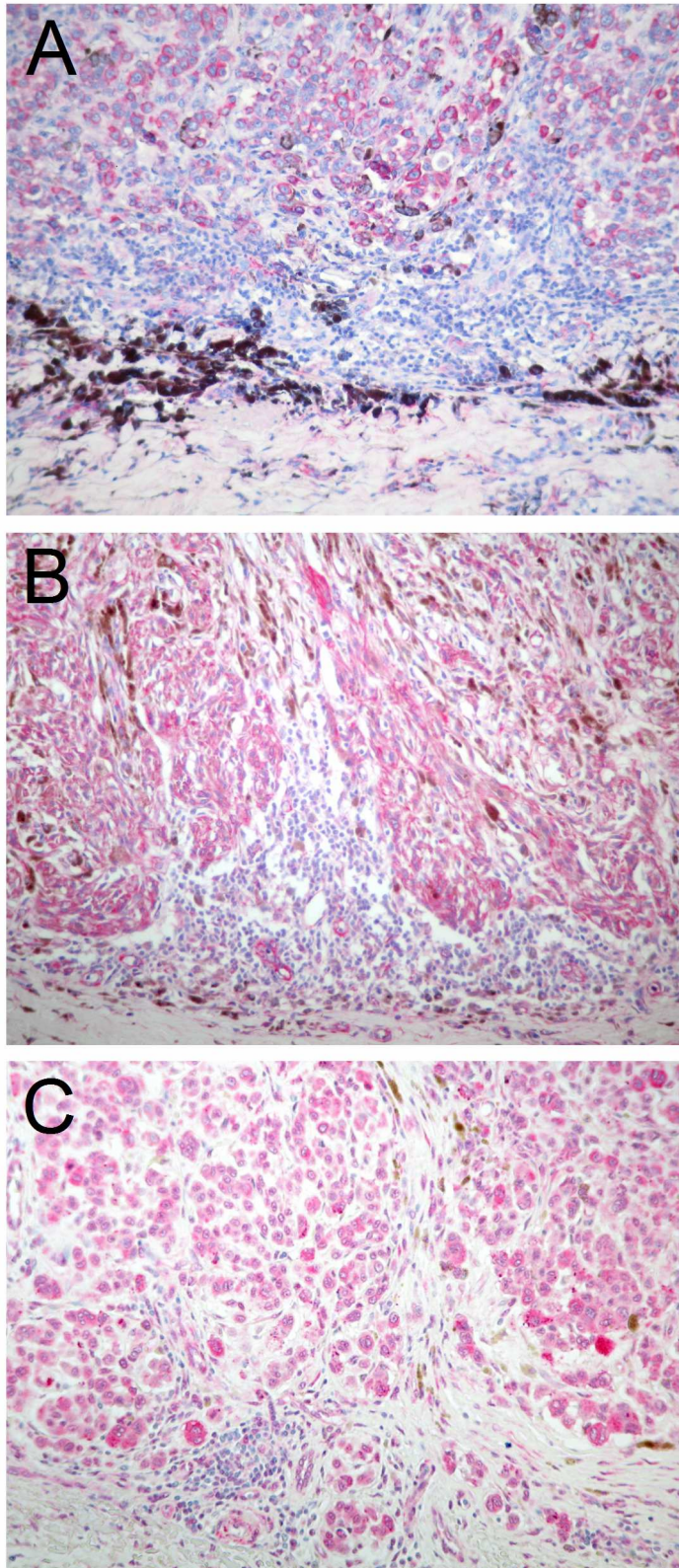


Fig. 10. Localizzazione immunoistochimica di nestina, vimentina e GR in campioni di melanoma. A, L'espressione della nestina era osservabile nel citoplasma delle cellule tumorali nel fronte di invasione. B, Vimentina nel fronte di invasione tumorale. C, Cellule positive per il GR lungo il fronte di invasione del tumore.

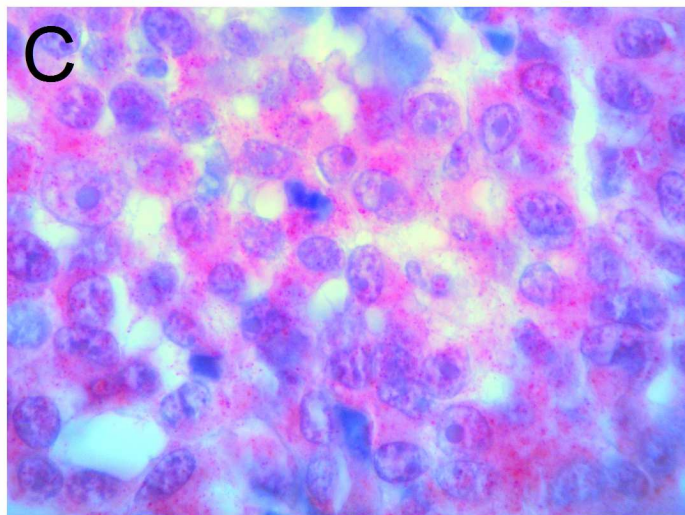
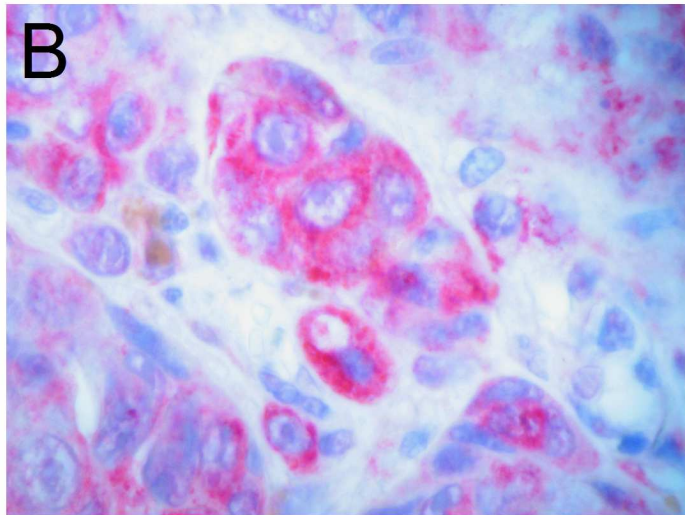
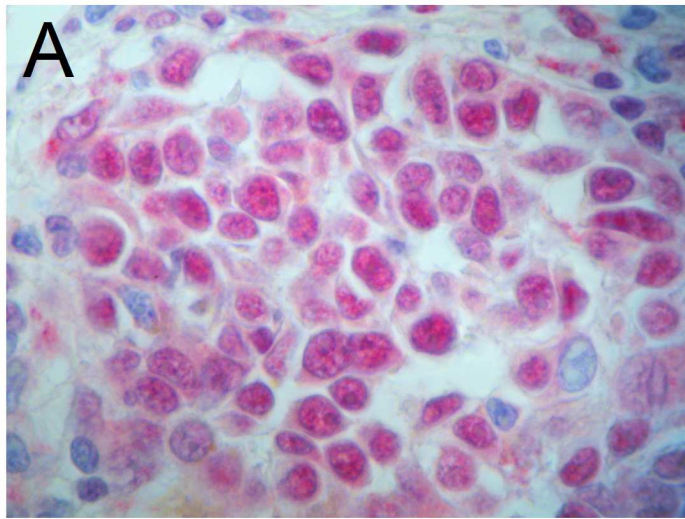


Fig. 11. A, Intensa immunoreattività nucleare per il GR nelle cellule tumorali. B, Forte reazione citoplasmatica del GR. C, Concomitante espressione nucleare e citoplasmatica del GR.

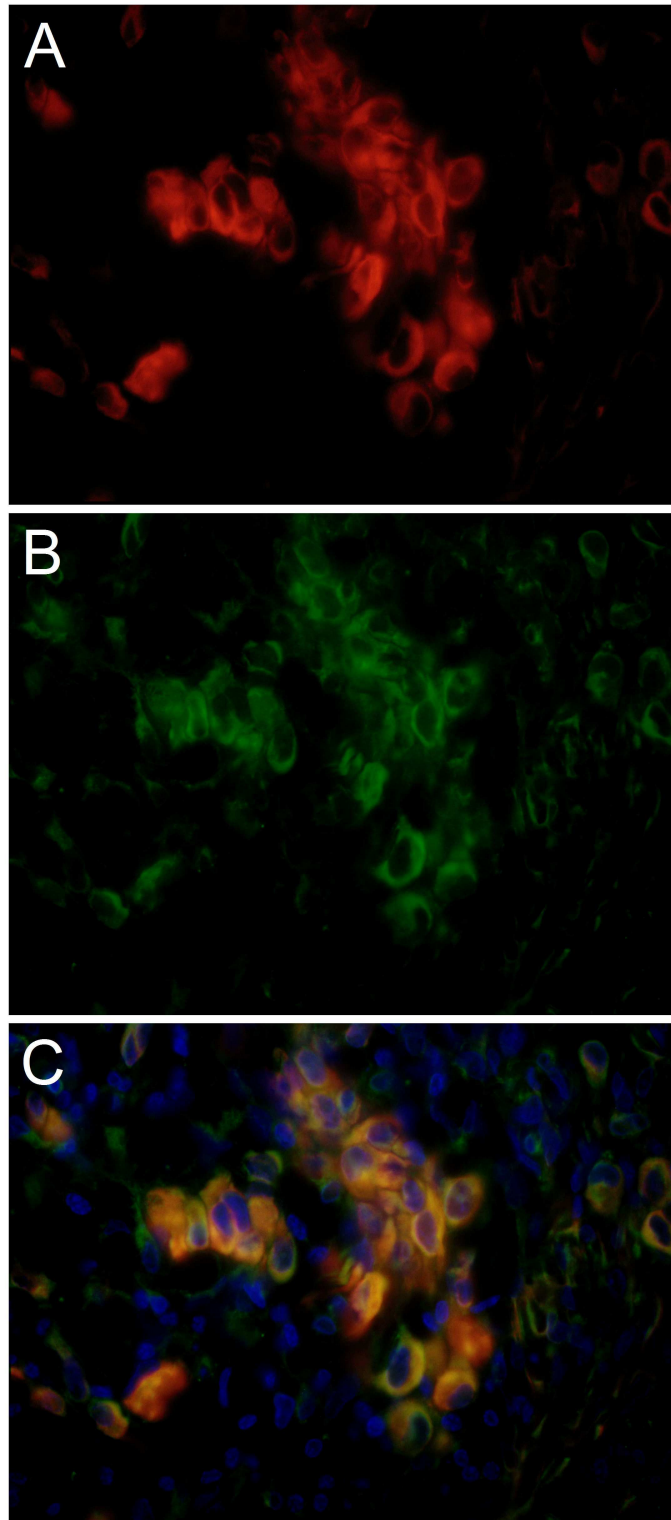


Fig. 12. Doppia colorazione in immunofluorescenza per la nestina (rosso) e vimentina (verde) nel melanoma (A, B). Immagine sommata della coespressione di nestina e vimentina (C). I nuclei sono di colore blu (4',6-diamidino-2-fenylindole, 405 nm).

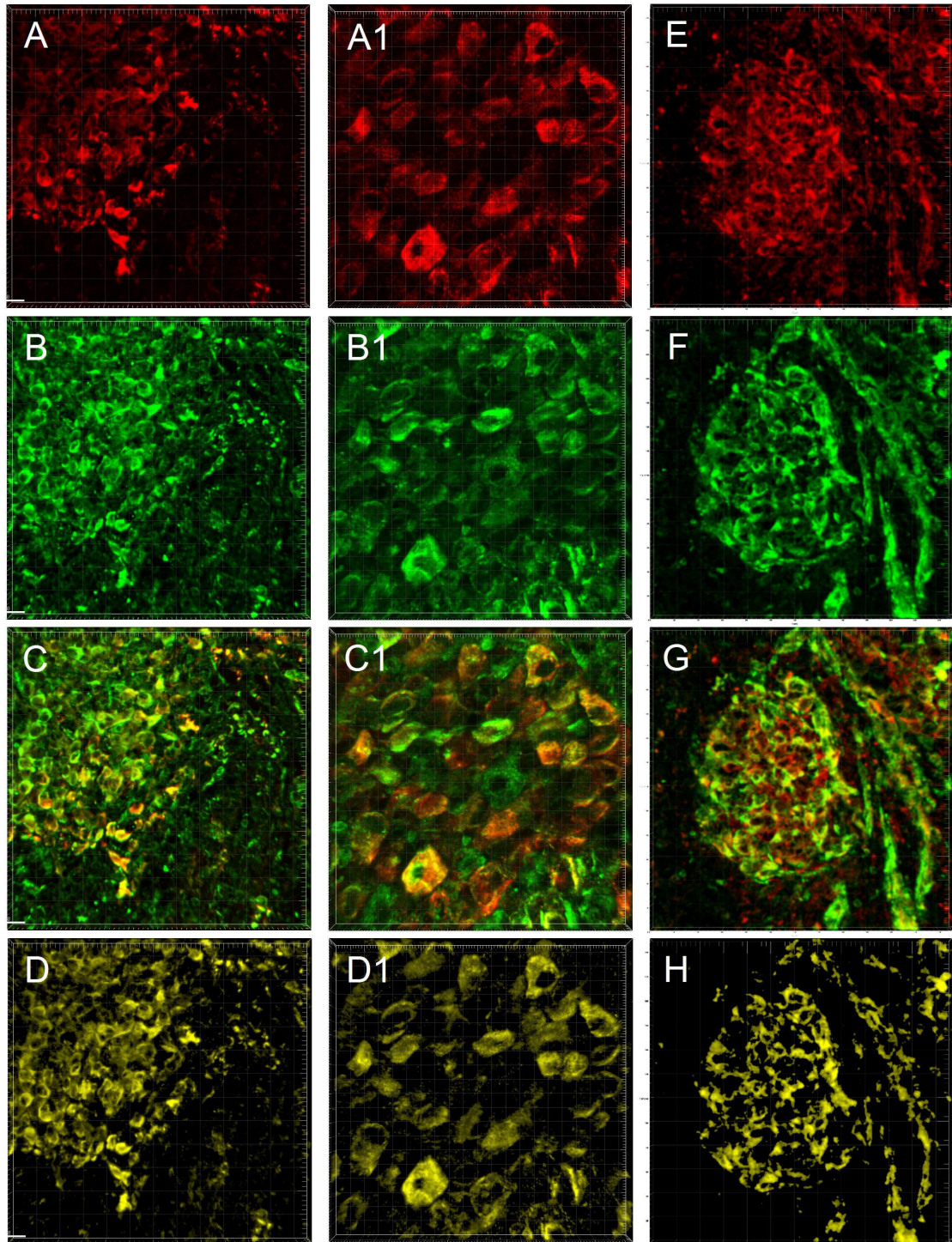


Fig. 13. Colocalizzazione di nestina e vimentina con doppia colorazione in immunofluorescenza determinata tramite microscopia confocale a scansione su campioni di melanoma. Immagini confocali di melanoma marcate con anticorpi anti-nestina (A, A1, rosso) e anti-vimentina (B, B1, verde). L'immagine composta è mostrata in (C) e (C1); le cellule positive sia per nestina che per vimentina sono marcate in giallo. Il solo canale di colocalizzazione è mostrato in (D) e (D1). In (E) e (F), viene mostrata la colocalizzazione del GR (rosso) e della nestina (verde), rispettivamente. (G) mostra l'immagine mediata delle cellule GR- e vimentina-positive mentre (H) mostra il solo canale di colocalizzazione.

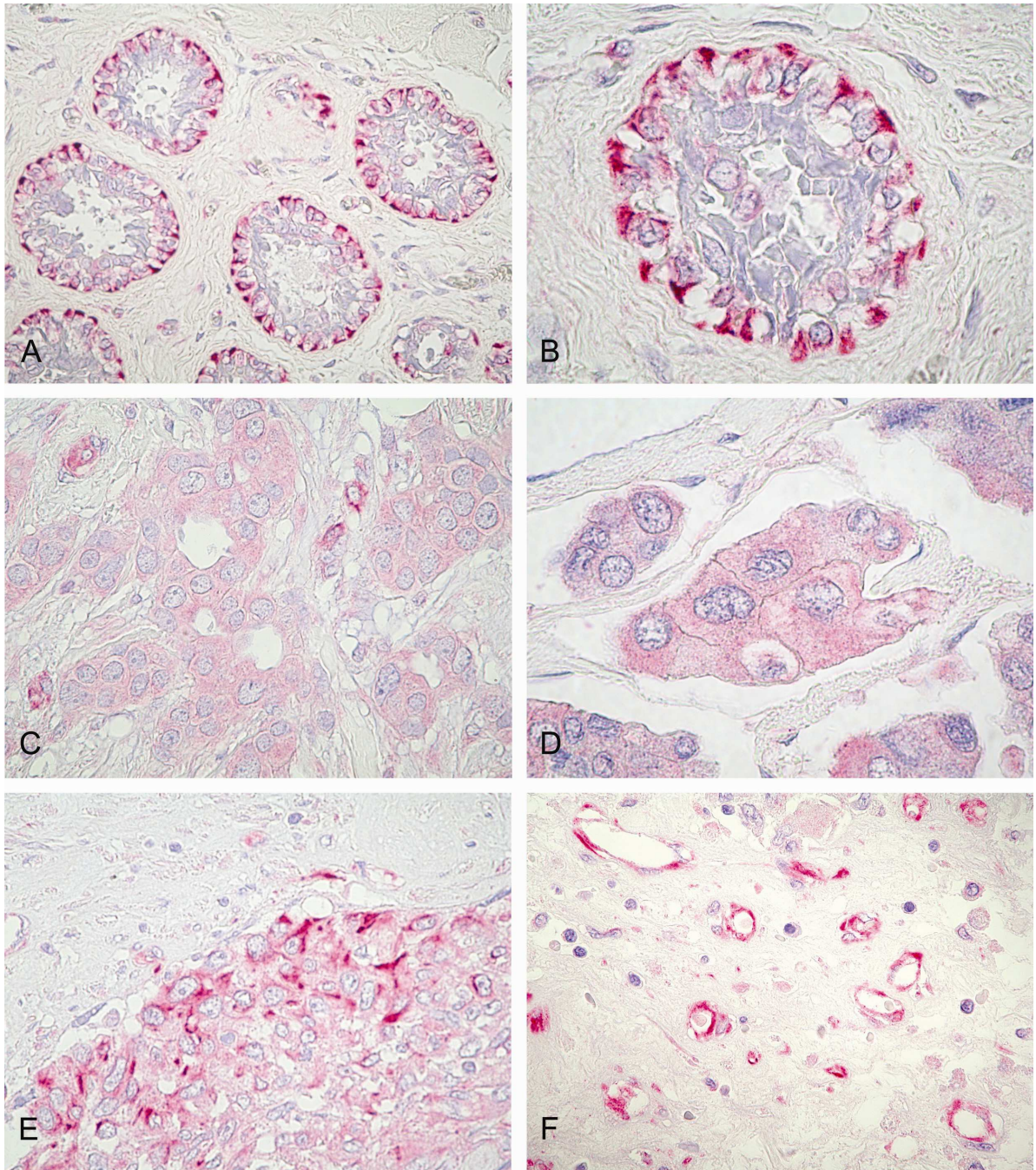


Fig. 14. Marcatura immunoistochimica della nestina nel tumore mammario. Le immagini in A e B mostrano positività per la nestina nel tessuto mioepiteliale di un'apparentemente normale ghiandola mammaria (controllo positivo interno); C), espressione citoplasmatica di nestina nelle cellule di un carcinoma mammario T4b con fenotipo ER+, PgR+, HER2-; D), nestina in cellule di carcinoma T4d infiammatorio di fenotipo ER+, PgR-, HER2-; E), nestina nelle cellule di carcinoma T4d infiammatorio di fenotipo Triple Negative ER-, PgR-, HER2-; F), intensa immunoreattività alla nestina delle cellule endoteliali all'interno dello stroma peritumorale. Ingrandimenti: x400 (A); x1000 (B, D); x630 (C, E, F).

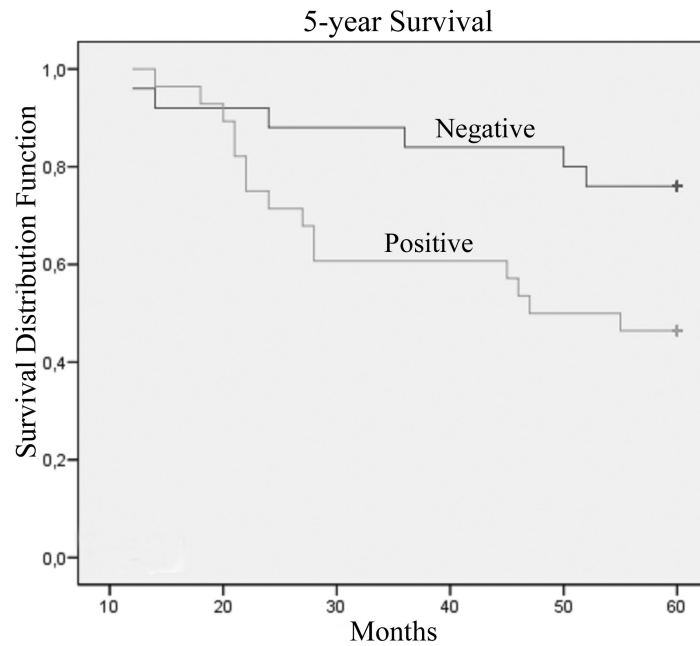


Fig. 15. Analisi del tempo di sopravvivenza condotta con il metodo di Kaplan-Meier's nei gruppi pazienti con differente espressione della nestina nel tumore alla mammella T4 (5 anni di sopravvivenza globale) ($P=0.02$).

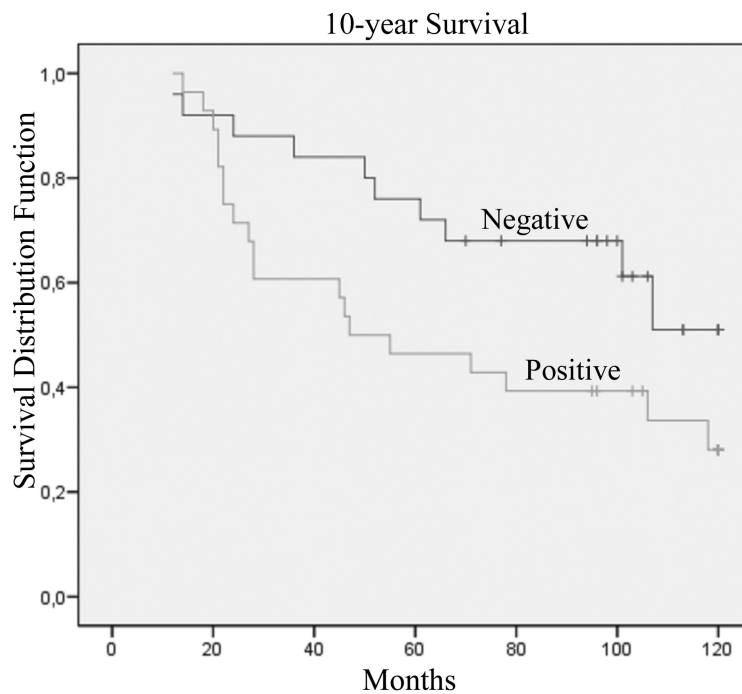


Fig. 16. Analisi del tempo di sopravvivenza condotta con il metodo di Kaplan-Meier's nei gruppi pazienti con differente espressione della nestina nel tumore alla mammella T4 (10 anni di sopravvivenza globale) ($P=0.05$).