



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAGLIARI

DIPARTIMENTO DI CITOMORFOLOGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MORFOLOGICHE

CURRICULUM: MORFOLOGIA, ULTRASTRUTTURA E CITOCHIMICA DEI TESSUTI

ED ORGANI

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DI CAGLIARI

**FATTORI PROGNOSTICI MOLECOLARI
NEL MELANOMA CUTANEO UMANO**

**Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Morfologiche
Dott.ssa DANIELA MURTAS**

Tutore: Prof.ssa PAOLA SIRIGU

Coordinatore: Prof. ALESSANDRO RIVA

ANNI ACCADEMICI: 2004-2007

Indice

1. Introduzione	4
2. Materiali e metodi	28
2.1. Selezione e prelievo dei campioni	29
2.2. Pazienti	29
2.2.1. Studio dell'infiltrato infiammatorio	29
2.2.2. Studio della survivina come fattore predittivo di recidiva e di sopravvivenza ai 5 anni	30
2.2.3. Studio della survivina, p53 e p16	30
2.2.4. Studio dell'8-OHdG, OGG1 e G6PD	31
2.3. Trattamento dei campioni	32
2.4. Metodica immunoistochimica streptavidina-biotina alcalin-fosfatasi (ABC)	32
2.5. Controlli	36
2.6. Valutazione dell'immunoreattività	37
2.6.1. Infiltrato infiammatorio	37
2.6.2. Survivina	38
2.6.3. p53 e p16	39

2.6.4.	8-OHdG, OGG1 e G6PD.....	40
2.7.	Analisi statistica.....	41
3.	Risultati.....	43
3.1.	Immunoistochimica.....	44
3.1.1.	Infiltrato infiammatorio.....	44
3.1.2.	Survivina, p53 e p16.....	45
3.1.3.	8-OHdG, OGG1 e G6PD.....	47
3.2.	Analisi statistica.....	48
3.2.1.	Infiltrato infiammatorio come fattore predittivo di sopravvivenza.....	48
3.2.2.	Survivina, p53 e p16 come fattori predittivi di sopravvivenza.....	49
3.2.3.	Survivina come fattore predittivo di recidiva.....	50
3.2.4.	Espressione della survivina in relazione a quella della p53 e della p16.....	51
3.2.5.	Espressione dell'8-OHdG in relazione a quella dell'OGG1, della G6PD, della p53 e della survivina.....	52
4.	Discussione.....	54
5.	Conclusioni.....	71
6.	Bibliografia.....	73

7.	Attività svolta durante il Dottorato di Ricerca ed elenco delle pubblicazioni.....	97
8.	Tabelle.....	103
9.	Iconografia.....	113

INTRODUZIONE

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, è infatti responsabile del 65% delle morti per cancro della cute (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 (Fig. 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). Invece il melanoma nodulare, fin dal primo momento, è un nodulo invasivo in profondità (melanoma cupoliforme) (Fig. 2).

L'incidenza del melanoma è in crescita costante in tutto il mondo, soprattutto tra gli individui giovani. L' Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stimato che annualmente, a livello mondiale, si verificano circa 132.000 nuovi casi di melanoma cutaneo e 66.000 morti per melanoma cutaneo e altri tumori della pelle (The World Health Organization, 2005). Tale aumento di incidenza è superiore a quello di qualsiasi altro tipo di tumore, ad eccezione del cancro del polmone nel sesso femminile. Per questo impressionante aumento di incidenza, tale da supportare il concetto di “epidemia di melanoma”, questo tumore ha assunto una valenza di emergenza sanitaria nelle popolazioni maggiormente colpite. Il picco di incidenza è compreso tra i 35 e i 50 anni di età, andando a colpire individui nel pieno della propria attività lavorativa e costituendo così un notevole problema anche dal punto di vista socio-economico.

Il melanoma cutaneo è decine di volte più frequente nei soggetti di ceppo europeo (Caucasici) rispetto alle altre etnie (Ries *et al*, 2004). I tassi di

incidenza più elevati, a livello mondiale, si riscontrano in aree molto soleggiate, come l'Australia e la Nuova Zelanda. Gran parte della popolazione infatti è rappresentata da Caucasici di origine europea, con pelle particolarmente chiara, emigrati in zone più vicine all'equatore con indici UV (valori di intensità della radiazione ultravioletta solare) significativamente più alti rispetto a quelli delle zone di provenienza.

In Italia ogni anno si verificano circa 7000 nuovi casi ed oltre 1600 morti per melanoma cutaneo (Parkin *et al*, 2003). Nelle regioni italiane settentrionali la mortalità è, per entrambi i sessi, circa il doppio di quella registrata nelle regioni meridionali. A livello delle diverse sedi anatomiche, l'aumento dell'incidenza è massimo per i melanomi del tronco e minimo per quelli della testa e del collo mentre, per quanto riguarda le estremità, si può rilevare un incremento più marcato a livello delle gambe nelle donne.

Numerose ipotesi sono state avanzate per giustificare il sostanziale aumento di incidenza del melanoma, ma la maggior parte degli studi suggerisce che l'esposizione al sole e ad altre fonti di radiazioni UV rappresenti un fattore critico. 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).

È ben noto che l'esposizione eccessiva alle radiazioni UV può provocare danni alla pelle e agli occhi e può ridurre l'efficacia del sistema immunitario.

La radiazione 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.

Inoltre, la deplezione dello strato di ozono sulla terra può contribuire all'aumento di incidenza, a livello globale, del melanoma, poiché radiazioni UV sempre più intense possono raggiungere la superficie della terra (Henriksen *et al*, 1990; Cummins *et al*, 2006).

Tra le radiazioni UV, la radiazione solare UV-A è stata indicata come il principale responsabile. Nell'eziologia della malattia altri fattori solo in parte identificati sono certamente coinvolti (Bataille, 2003).

Tra i vari fattori di rischio, chiamati in causa nell'insorgenza del melanoma, vi sarebbe una predisposizione genetica. Da alcuni studi è emerso che vi sono mutazioni nella linea germinale del gene soppressore tumorale *CDKN2A* (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A), 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. In un numero elevato di famiglie in cui si è vista una predisposizione a sviluppare il melanoma, ma anche in pazienti con

melanoma multiplo o melanoma sporadico, è stata rilevata una correlazione tra l'incidenza del melanoma e mutazioni germinali del gene *CDKN2A* (Kamb *et al*, 1994; Goldstein and Tucker, 2005), ritenuto il più noto gene di suscettibilità al melanoma. Un ulteriore fattore di rischio è rappresentato dalle alterazioni del gene che codifica per il Recettore 1 della Melanocortina (MC1R) che portano ad un'alterata sintesi di melanina, associata ad un maggiore rischio di sviluppare il melanoma.

Altre alterazioni 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). Da un punto di vista patogenetico, le mutazioni *N-ras* e *BRAF* comparirebbero in una fase precoce, quelle *PTEN* in una fase tardiva della progressione tumorale.

Esistono grandi differenze tra Paesi Europei in termini di sopravvivenza dei pazienti con melanoma cutaneo: la sopravvivenza è più alta in quasi tutti i Paesi dell'Europa occidentale. Questo può essere legato a una diagnosi precoce di lesioni superficiali, grazie a un'intensa campagna di prevenzione. 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). I melanomi localizzati sugli arti inferiori tendono ad avere una prognosi migliore rispetto a quelli localizzati sulla cute del capo, del collo e del tronco (Dickman *et al*, 1999; Schuchter *et al*, 1996; Clemente *et al*, 1996; Aitchison *et al*, 1995). La sopravvivenza media dei pazienti con melanoma, nonostante l'aumento di incidenza, è migliorata negli anni. Secondo alcuni autori, l'aumento dell'attenzione della popolazione e dei 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. E' da sottolineare come la diagnosi precoce rappresenti 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 dei fattori prognostici clinici e istopatologici. I modelli prognostici rappresentano un valido strumento per assegnare i pazienti a diversi gruppi di rischio in base alle aspettative di sopravvivenza, una suddivisione che risulta di particolare importanza nella gestione clinica delle neoplasie. I fattori istopatologici più ampiamente utilizzati sono: la fase di progressione del tumore, il livello di invasione di Clark, l'indice mitotico, i

satelliti, l'invasione angio-linfatica, i linfociti infiltranti il tumore, la regressione, lo spessore del tumore secondo Breslow, l'ulcerazione e le metastasi linfonodali.

- 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. Nella *fase di crescita verticale* (Vertical Growth Phase, VGP), le cellule tumorali hanno acquisito la capacità di sopravvivere e proliferare autonomamente nel derma e formano aggregati o noduli che si estendono al derma reticolare e al sottocute. La possibilità di metastatizzazione è molto rara nei melanomi con crescita radiale, tuttavia si può riscontrare una percentuale di mortalità seppur bassa anche in questi tumori (Elder *et al*, 2005).

- *Il livello di Clark* classifica i melanomi in cinque livelli di invasione (Clark, 1967; Clark *et al*, 1989). La microstadiazione di Clark si basa sulla profondità dell'invasione cutanea, che può essere associata alla malignità delle cellule e quindi alla progressione del tumore. 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. Al contrario, il *livello III* di invasione rappresenta un vero e proprio tumore con un nodulo a crescita verticale che si espande nel derma papillare, arrivando fino all'interfaccia tra derma papillare e 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", in cui le cellule tumorali riescono a sopravvivere per aver acquisito nuove caratteristiche. Il *livello V* è caratterizzato dall'infiltrazione delle cellule tumorali 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 il risultato dell'*invasione angio-linfatica*. Diversi studi hanno mostrato 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).

- Una diretta correlazione tra una maggiore densità di *linfociti infiltranti* il tumore (TILs) e una prolungata sopravvivenza è stata evidenziata (Clark *et al*, 1989; Cook, 1992; Clemente *et al*, 1996; Mihm *et al*, 1996; Tuthill *et al*, 2002). In un modello prognostico proposto da alcuni autori (Clark, 1989), la distribuzione dei linfociti infiltranti il tumore può essere definita come “brisk”, quando una densa banda di linfociti infiltranti è presente tra le cellule tumorali e sembra distruggerle e l’intera base del tumore o l’intero tumore risultano infiltrati; “non-brisk”, se sono presenti alcuni linfociti infiltranti il tumore; “absent”, quando non sono presenti linfociti infiltranti.

- *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 e assenza di melanoma (Elder *et al*, 2005). Il valore prognostico della regressione è ancora in fase di discussione.

- Allo stato attuale, il nuovo sistema di stadiazione dell’American Joint Committee on Cancer (AJCC) (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 metastasi linfonodali, 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 (Figg. 3, 4). Il metodo di microstadiazione di Breslow (Breslow, 1970) determina l'effettivo *spessore del tumore*; utilizzando un oculare micrometrico, lo spessore massimo verticale del melanoma viene misurato nella sezione istologica dalla parte più superficiale dello strato granuloso della cute (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. *L'ulcerazione* viene definita come una locale perdita di continuità dell'epitelio lungo tutto il suo spessore, 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 è 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). *Le metastasi nei linfonodi regionali* possono essere scoperte al momento della diagnosi del tumore primario o in un momento successivo. Il numero di linfonodi coinvolti è altamente predittivo di prognosi.

Dai numerosi studi apparsi in letteratura, risulta che il fattore prognostico più rilevante per i tumori confinati alla sede primaria è lo spessore del melanoma determinato secondo i criteri di Breslow. Se il melanoma, al momento della diagnosi, risulta ancora confinato agli strati cutanei superficiali la prognosi è generalmente buona, con guarigione del paziente. Viceversa, se il melanoma ha raggiunto gli strati più profondi, perché ha avuto tempo di accrescersi prima della sua identificazione ed asportazione, i rischi per la vita del paziente sono molto elevati. La diagnosi precoce di melanoma costituisce, unitamente al corretto intervento chirurgico con analisi istopatologica e con la ricerca del linfonodo sentinella, il più favorevole fattore prognostico per il paziente. Attualmente viene diagnosticato un numero sempre più cospicuo di melanomi cutanei “sottili” (≤ 1 mm), generalmente associati ad 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 sia il più importante fattore prognostico nel melanoma, per le lesioni “sottili” è indispensabile l'identificazione di altri parametri morfologici e/o molecolari, più strettamente correlati alla biologia delle cellule tumorali, che possano predire la progressione neoplastica e contribuire all'identificazione dei

pazienti a maggior rischio di diffusione della malattia, al fine di migliorarne la gestione clinica complessiva.

La presenza di infiammazione e regressione nei melanomi primari è stata considerata un forte indicatore dell'esistenza di una risposta immunitaria antitumorale (Cook, 1992; Fig. 5). Il melanoma cutaneo di stadio I e II (secondo il sistema di stadiazione dell'AJCC) è quasi sempre associato ad un infiltrato infiammatorio cronico, costituito principalmente da linfociti. Alcuni studi hanno dimostrato che la localizzazione e l'estensione dell'infiltrazione da parte di cellule dendritiche e l'espressione delle cellule HLA-DR (Human Leukocyte Antigen-D-related) sono associate alla risposta clinica e ad un'aumentata sopravvivenza (Konstadoulakis *et al*, 1998; Zehntner *et al*, 1999). Inoltre, l'infiltrazione da parte dei macrofagi (CD68) è strettamente correlata con la profondità del tumore e l'angiogenesi (Torisu-Itakura *et al*, 2000). Tuttavia, la valutazione dei linfociti infiltranti il tumore sembra essere soggetta ad una grande variabilità (Busam *et al*, 2001). Il ruolo centrale dei linfociti T nell'immunità antitumorale è ben nota, tanto che sono stati finora caratterizzati numerosi antigeni associati al melanoma e riconosciuti dai linfociti T. La risposta dei linfociti T a questi antigeni è eterogenea in quanto gli antigeni possono essere riconosciuti dai linfociti T helper, nell'ambito delle molecole HLA-II (Human Leukemic Antigen II), o dai linfociti T

citotossici nell'ambito delle molecole HLA di classe I. Alla luce di queste conoscenze, numerosi studi riguardanti le immunoterapie e i vaccini hanno valutato la presenza dei linfociti T citotossici (che esprimono il recettore CD8) e di quelli helper (che esprimono il recettore CD4) come indice di attività antitumorale e regressione tumorale associate alla risposta immunitaria del paziente (Hakansson *et al*, 1996; Hakansson *et al*, 1998; Hakansson *et al*, 2001; Hakansson *et al*, 2003; Qiang *et al*, 2004; Obata *et al*, 2004; Dissanayake *et al*, 2004). I linfociti citotossici riconoscono antigeni estranei presenti sulla superficie delle cellule. Durante il riconoscimento esprimono il ligando del Fas, che è una molecola legata alla membrana o presente in fase solubile prodotta dalle cellule del sistema immunitario. In seguito al legame con il Fas, espresso dalle cellule bersaglio, viene attivato il programma di morte o apoptosi. Tuttavia, rimane ancora controverso il significato prognostico dei linfociti T infiltranti i tumori solidi (Bodey *et al*, 2000).

Normalmente, l'apoptosi è indotta dal gene oncosoppressore *p53* mediante un meccanismo innescato da un danno al DNA. Il gene oncosoppressore *p53*, coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare, ha un'attività anti-proliferativa e anti-trasformante (Giglia-Mari and Sarasin, 2003) e può causare l'arresto del ciclo cellulare in fase G1 o indurre apoptosi. E' localizzato nel

cromosoma 17 in posizione 17p13.1 e rappresenta la seconda sede più frequente di alterazioni genetiche nei tumori umani, infatti più del 50% dei tumori umani presenta mutazioni di questo gene. Tale osservazione suggerisce che la proteina p53 funzioni come un attento guardiano che vigila sul genoma e sull'insorgenza di neoplasie, prevenendo la proliferazione delle cellule che hanno subito un danno genetico (Levine, 1997; Fig. 6). La proteina p53 è localizzata nel nucleo e, quando entra in azione, la sua funzione primaria è rappresentata dal controllo della trascrizione di diversi altri geni. In condizioni fisiologiche, la p53 ha una breve emivita (20 minuti), probabilmente per l'azione proteolitica del sistema mediato dalla ubiquitina e, pertanto, normalmente non risulta rivelabile con metodiche immunoistochimiche. La proteina p53 entra invece in gioco, come freno di emergenza, quando il DNA è danneggiato da radiazioni ionizzanti, luce UV o sostanze chimiche mutagene, in tali circostanze la proteina si attiva e va incontro ad importanti modificazioni. Con meccanismi ancora poco compresi, si osserva un rapido aumento dei livelli di p53 e una sua attivazione come fattore di trascrizione. Il prodotto del gene *p53* si lega al DNA e stimola la trascrizione di alcuni geni che mediano due funzioni fondamentali: l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi. L'arresto del ciclo cellulare avviene nella fase G1 tardiva ed è causato dalla trascrizione dell'inibitore delle chinasi ciclina-

dipendenti (Cdk) *p21*. Il prodotto del gene *p21* inattiva i complessi ciclina/Cdk inibendo, in questo modo, la fosforilazione di *pRb* (proteina del retinoblastoma) necessaria per la progressione del ciclo cellulare alla fase S. Questa interruzione del ciclo cellulare è importante in quanto dà alla cellula il tempo per riparare il danno al DNA prodotto dall'agente mutageno. La p53 interviene direttamente in questo processo inducendo la trascrizione di *GADD45* (Growth Arrest and DNA Damage), il gene che codifica per una proteina coinvolta nei processi di riparazione del DNA. Se il danno al DNA viene riparato con successo, la p53 attiva un gene chiamato *mdm2* (murine double minute 2) il cui prodotto si lega a sua volta al gene della p53 e lo inattiva, sbloccando in questo modo il ciclo cellulare. Se invece, durante l'arresto del ciclo cellulare, il DNA non può essere riparato in maniera soddisfacente, la p53 come ultimo atto porta la cellula a morte attivando geni che inducono apoptosi. I geni *bax* (Bcl-2-associated X protein) e *IGF-BP3* (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3) sono due geni che stanno sotto il controllo della p53 e che eseguono l'ordine di morte che parte da essa. Il prodotto del gene *bax* si lega alla proteina Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), un inibitore dell'apoptosi, e ne blocca l'azione; IGF-BP3 si lega invece al recettore dell'IGF (Insulin-like Growth Factor) e induce l'apoptosi presumibilmente bloccando la trasmissione del segnale intracellulare mediato

dall'IGF. E' importante sottolineare che l'attivazione trascrizionale dei geni controllati dalla p53, quali *p21*, *GADD45* e *bax*, è di fondamentale importanza per il normale funzionamento del gene *p53* stesso. In accordo con questi dati, è stato osservato che le mutazioni che più frequentemente interessano la p53 colpiscono il dominio con cui la proteina si lega al DNA, precludendo in tal modo la trascrizione di geni che sono sotto il suo controllo. Si ritiene inoltre che la p53 possa interagire con altre proteine, anche se questo meccanismo non è ancora perfettamente compreso. Nelle cellule in cui il gene *p53* è perso o mutato, un danno al DNA non induce l'arresto del ciclo cellulare, l'attivazione dei meccanismi preposti alla riparazione del danno stesso, né l'apoptosi e pertanto tali cellule continuano a proliferare, fino a generare una neoplasia maligna.

Le cellule tumorali hanno mostrato di resistere al programma di morte cellulare con un'alterata espressione di proteine apoptotiche, come la p53, e anche di proteine anti-apoptotiche, eludendo in questo modo i meccanismi di sorveglianza cellulare.

Fra le proteine che hanno attività anti-apoptotica recentemente è stata descritta la survivina, un omodimero di 142 aminoacidi, la più piccola delle IAPs (Proteine Inibitrici dell'Apoptosi) (Salvesen and Duckett, 2002), che risulta espressa in numerosi tessuti fetali e tumori, mentre non è presente nei

tessuti adulti normali (Adida *et al*, 1998; Kawasaki *et al*, 1998; Swana *et al*, 1999). Il gene della survivina è localizzato nel cromosoma 17 in posizione 17q25 e la sua trascrizione risulta essere dipendente dal ciclo cellulare (Li *et al*, 1998). La survivina è coinvolta in varie funzioni essenziali per la cellula, come la mitosi, l'apoptosi, la risposta allo stress cellulare e in diversi meccanismi chiave per l'integrità genomica (Fig. 7). L'espressione di questa proteina si riscontra soprattutto durante la fase G2/M del ciclo cellulare (Li *et al*, 1998); essa svolge un ruolo importante nel controllo della divisione cellulare attraverso l'associazione con la chinasi Aurora B, la proteina INCENP (Inner Centromere Protein) e la proteina Borealin/Dasra B nel "chromosomal passenger complex" (Li, 2003; Gassmann *et al*, 2004), in cui la survivina è essenziale per la corretta segregazione cromosomica e la citochinesi (Vong *et al*, 2005; Li and Ling, 2006). La survivina è inoltre coinvolta nella formazione del fuso mitotico, dove può influenzare la stabilità dei microtubuli (Giodini *et al*, 2002), e nella progressione del ciclo cellulare delle cellule tumorali, promuovendo la transizione G1/S (Li and Ling, 2006). Recenti studi hanno indicato che questa proteina, non solo è localizzata nell'apparato mitotico e nel centromero/cinetocoro dei cromosomi, ma è anche localizzata nei mitocondri delle cellule tumorali (Li and Ling, 2006). Sono stati distinti due pool subcellulari della survivina (Fortugno *et al*, 2002)

ed è stato suggerito che il pool nucleare sia coinvolto nel promuovere la proliferazione cellulare, mentre quello citoplasmatico potrebbe essere coinvolto nel controllo della sopravvivenza (Li *et al*, 2005). Numerosi studi hanno infatti dimostrato che l'espressione della survivina protegge le cellule normali o trasformate dall'apoptosi (Altieri, 2003; Zangemeister-Wittke and Simon, 2004; Wheatley and McNeish, 2005; Altieri, 2006). Il meccanismo con cui la proteina antagonizza la morte cellulare non è ancora ben chiaro; sembra che la sua funzione di inibizione dell'apoptosi, innescata dalla via estrinseca o intrinseca, sia legata alla sua capacità di inibire direttamente o indirettamente le caspasi (Fig. 8). Probabilmente, in risposta a stimoli apoptotici, la survivina viene rilasciata dai mitocondri nel citoplasma dove si lega alle caspasi, come la caspasi-9, bloccando in questo modo il processo dell'apoptosi (Dohi *et al*, 2004). Il ruolo cruciale della survivina nella protezione dall'apoptosi è supportato dal fatto che la sua inibizione da parte di RNA antisense causa apoptosi spontanea (Olie *et al*, 2000), mentre una sua espressione forzata contrasta la morte cellulare indotta da stimoli apoptotici (Li *et al*, 1998).

In aggiunta al trascritto di survivina originariamente identificato, in cellule umane sono state trovate nuove isoforme, derivanti da uno splicing alternativo, denominate survivina- Δ Ex3, survivina-2B, survivina-3B e

survivina-2 α (Mahotka *et al*, 1999; Mahotka *et al*, 2002; Badran *et al*, 2004; Caldas *et al*, 2005). Queste varianti presentano una diversa localizzazione cellulare e una diversa funzione; la survivina- Δ Ex3 è localizzata a livello nucleare, la survivina-2B nel citoplasma, in particolare nei mitocondri, la survivina-2 α è legata ai centromeri dei cromosomi in divisione, mentre la localizzazione della survivina-3B non è ancora ben chiara. Mentre le isoforme Δ Ex3 e 3B conservano l'attività anti-apoptotica, le 2B e 2 α presentano una marcata riduzione delle proprietà anti-apoptotiche.

In diversi studi, l'overespressione della survivina è stata associata a resistenza alle terapie e a ridotta sopravvivenza in pazienti con tumore (Zaffaroni *et al*, 2005; Altieri, 2003; Giodini *et al*, 2002; Zaffaroni *et al*, 2002) ed è stata quindi considerata un marker con significato prognostico nell'evoluzione di queste neoplasie.

La proteina p16^{INK4a} è un soppressore tumorale capace di indurre il blocco del ciclo cellulare in G1, contribuendo al controllo della proliferazione cellulare. Il suo gene è localizzato nel cromosoma 9 in posizione 9p21.3 e codifica sia per la proteina p16^{INK4a} che per la p14ARF, trascritte da due diversi esoni. La proteina p16 blocca la progressione del ciclo cellulare alla fase S inibendo le chinasi ciclina-dipendenti Cdk4 e Cdk6 (Ohtani *et al*, 2004). Il substrato di questi complessi enzimatici è la proteina pRb la cui fosforilazione in fase G1

consente la progressione del ciclo cellulare (Sherr, 1994). Nella fase G1 di una cellula normale, la forma non fosforilata della proteina pRb si lega a un complesso formato da due fattori trascrizionali chiamati E2F-1 (E2F transcription factor 1) e DP-1 (transcription factor DP-1) e, fino a quando si mantiene questa situazione, le cellule rimangono in G1. Se viene segnalata la progressione attraverso il ciclo cellulare, pRb viene fosforilata dai complessi ciclina D/Cdk4 e ciclina D/Cdk6, è resa incapace di legare E2F e porta alla progressione del ciclo cellulare. Il gene della p16 risulta frequentemente mutato o deletato in molti tumori, compreso il melanoma, tanto da essere tuttora in fase di studio al fine di chiarire il suo coinvolgimento nella patogenesi e nella predisposizione verso queste neoplasie (Fig. 9).

Nella patogenesi di numerosi tumori, compreso il melanoma cutaneo, è stato implicato lo stress ossidativo indotto dalle radiazioni UV (Sander *et al*, 2004; Fig. 10). Lo stress ossidativo può danneggiare numerose strutture cellulari e bio-macromolecole, compresi gli acidi nucleici. Tra le quattro basi del DNA, la guanina, con il più basso potenziale di ossidazione, è quella preferenzialmente attaccata dai radicali idrossilici, anche in presenza di bassi livelli di stress ossidativo (Steenken and Jovanovic, 1997). Uno tra i danni ossidativi più frequenti è la formazione della 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG), una base modificata generata dall'ossidazione della deossiguanosina

in posizione 8 (Fig. 11), a carico del DNA nucleare e mitocondriale (mtDNA). Se questa modificazione nucleotidica non viene riparata, durante la replicazione la DNA polimerasi inserirà preferenzialmente, come base complementare all'8-OHdG, un'adenina che a sua volta si accoppierà con una timina, portando a una transversione G→T (G:C→T:A). Per questo, l'8-OHdG viene considerata una lesione promutagena e un sensibile biomarker del danno ossidativo al DNA (Wallace, 2002; Bjelland and Seeberg, 2003). Queste mutazioni, portando a instabilità genomica, possono dunque condurre a un fenotipo di cellule tumorali più aggressive (Shen *et al*, 2007).

Diversi enzimi svolgono un ruolo di protezione contro lo stress ossidativo, in particolare la 8-oxoguanina DNA-glicosilasi 1 (OGG1), la cui ridotta attività è stata associata ad un aumentato rischio di tumore, e la glucoso-6-fosfato deidrogenasi (G6PD), un enzima coinvolto nella difesa anti-ossidante. L'OGG1 è un enzima specifico per la riparazione delle lesioni 8-OHdG. Esso catalizza in modo specifico l'escissione della base modificata e il ripristino della parte mancante di DNA. L'OGG1 è codificato da un gene localizzato sul cromosoma 3 in posizione 3p26.2 (Arai *et al*, 1997) che, mediante splicing alternativo, dà origine a diverse forme isoenzimatiche (Ia, Ib, Ic, Id, II), di cui la Ia presenta una localizzazione nucleare e tutte le altre una localizzazione mitocondriale (Mukunyadzi *et al*, 2003). E' stato suggerito che alti livelli di

8-OHdG inducono l'espressione dell'OGG1 e che una ridotta attività di questo enzima sia associata ad un aumentato rischio di sviluppare un tumore, per la mancata riparazione dei danni ossidativi al DNA.

La G6PD è l'enzima che catalizza la prima reazione della via dei pentoso fosfati, durante la quale si genera il NADPH, un riducente importantissimo nei processi anabolici ma anche un importante cofattore di enzimi che catalizzano la detossificazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), le quali possono causare danno ossidativo al DNA. In tal modo, la G6PD svolge un ruolo importante nella difesa contro gli agenti ossidanti e nel mantenimento dell'equilibrio ossidazione/riduzione nella cellula (Luzzatto and Battistuzzi, 1985; Cheng *et al*, 2004). Il gene che codifica per la G6PD si trova sul cromosoma X in posizione q28 e, per la sua alta variabilità genetica, la G6PD presenta diverse varianti caratterizzate da un ampio range di livelli di attività enzimatica.

Questo studio è stato concepito e sviluppato con l'intento di individuare marcatori molecolari prognostici precoci nel melanoma, utili per la selezione dei pazienti maggiormente esposti a recidiva/metastasi da indirizzare verso terapie adjuvanti adeguate al tipo di alterazione molecolare presente. Campioni di melanoma maligno cutaneo, provenienti da pazienti sardi ed ecuadoriani, sono stati esaminati immunostochimicamente sia per l'aspetto

immunologico che per la determinazione della presenza di proteine soppressori tumorali, pro-apoptotiche e anti-apoptotiche.

Poiché nella patogenesi del melanoma cutaneo sembrerebbe coinvolto il danno ossidativo al DNA indotto dalla radiazione UV, è stata studiata l'espressione di markers di stress ossidativo e di enzimi coinvolti nella protezione delle cellule da tale stress.

Tale studio è parte di un programma di ricerca scientifica di interesse nazionale e internazionale, finanziato dal Ministero dell'Università e della Ricerca (MIUR) e dal Ministero degli Affari Esteri (MAE) Italiano ed Ecuadoriano, dal titolo "Incidenza dei fattori ambientali e genetici sullo sviluppo dei melanomi, di lesioni degenerative congiuntivali e del carcinoma del collo dell'utero", di cui è responsabile scientifico la Prof.ssa Paola Sirigu.

MATERIALI E METODI

2.1. Selezione e prelievo dei campioni

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 Gennaio 1995 a Maggio 2006. Da questo gruppo sono stati selezionati i pazienti con i seguenti requisiti: diagnosi di melanoma, disponibilità di dati clinico-patologici, compreso un follow-up completo, e del tumore primario in blocco di paraffina. Lo stato linfonodale e la presenza di metastasi sono stati valutati sia con esame clinico che patologico.

2.2. Pazienti

2.2.1. Studio dell'infiltrato infiammatorio

Dai campioni pervenuti fra Gennaio 1995 e Gennaio 2002, sono stati selezionati 47 casi con completo follow-up ad Aprile 2004. Il gruppo dei pazienti includeva 25 donne e 22 uomini di età compresa tra gli 11 e i 93 anni (età media 57 anni). I melanomi erano localizzati sulla cute della testa e del collo in 18 pazienti, del tronco in 10 pazienti e degli arti in 19 pazienti. Un solo melanoma presentava un II livello di invasione di Clark, 11 presentavano

un III livello, 24 un IV livello e 11 un V livello. Secondo il sistema di stadiazione AJCC, 7 melanomi erano di stadio IA, 8 di stadio IB, 16 di stadio IIA, 14 di stadio IIB e 2 di stadio IIC.

2.2.2. Studio della survivina come fattore predittivo di recidiva e di sopravvivenza ai 5 anni

Sono stati esaminati campioni di melanoma provenienti da 50 pazienti con completo follow-up ad Ottobre 2005, pervenuti da Gennaio 1995 a Gennaio 2000.

I pazienti comprendevano 30 donne e 20 uomini, di età compresa tra gli 11 e i 93 anni (età media 54.4 anni). I melanomi erano localizzati sulla cute della testa e del collo in 14 pazienti, del tronco in 14 pazienti e degli arti in 22 pazienti. Undici melanomi presentavano un II livello di invasione di Clark, 18 un III livello, 12 un IV livello e 9 un V livello. Secondo il sistema di stadiazione AJCC, 22 melanomi erano di stadio IA, 8 di stadio IB, 11 di stadio IIA, 7 di stadio IIB e 2 di stadio IIC.

2.2.3. Studio della survivina, p53 e p16

Campioni di tumore sono stati ottenuti da 68 pazienti con melanoma diagnosticato da Novembre 1995 a Maggio 2006 e con completo follow-up a

Gennaio 2007 per 64 pazienti. I pazienti includevano 38 donne e 30 uomini di età compresa tra i 12 e i 100 anni (età media 67.2 anni). I melanomi erano localizzati sulla cute della testa e del collo in 14 pazienti, del tronco in 16 pazienti, degli arti superiori in 11 pazienti e degli arti inferiori in 27 pazienti. Dieci melanomi presentavano un II livello di invasione di Clark, 16 un III livello, 24 un IV livello e 18 un V livello. Secondo il sistema di stadiazione AJCC, 19 melanomi erano di stadio IA, 8 di stadio IB, 19 di stadio IIA, 20 di stadio IIB e 2 di stadio IIC.

2.2.4. Studio dell'8-OHdG, OGG1 e G6PD

Sono stati esaminati 54 campioni di melanoma pervenuti da Novembre 1995 a Maggio 2006. I pazienti comprendevano 30 donne e 24 uomini, di età compresa tra i 4 e i 100 anni (età media 67.1 anni). I melanomi erano localizzati sulla cute della testa e del collo in 8 pazienti, del tronco in 7 pazienti e degli arti in 39 pazienti. Due melanomi presentavano un II livello di invasione di Clark, 5 un III livello, 18 un IV livello e 29 un V livello. Secondo il sistema di stadiazione AJCC, 1 melanoma era di stadio IA, 3 di stadio IB, 8 di stadio IIA, 13 di stadio IIB, 1 di stadio IIC e 28 di stadio III-IV.

2.3. Trattamento dei campioni

Le biopsie sono state fissate in formalina tamponata al 10%, pH 7.3, 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.

2.4. Metodica immunohistochimica streptavidina-biotina alcalin-fosfatasi (ABC)

La seguente metodica è stata utilizzata per la localizzazione di:

- markers tumorali HMB45, S100, Melan A
- antigeni di cellule effettrici immunitarie CD8, CD4, HLA-DR, CD68
- proteina pro-apoptotica p53
- proteina oncosoppressore p16
- proteina anti-apoptotica survivina

- marker di danno ossidativo al DNA 8-OHdG
 - enzimi antiossidanti citoprotettori OGG1, G6PD
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, S100, CD68 e G6PD;
 - 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 o in una soluzione di EDTA (etilendiaminotetracetato) 10 mM, pH 8.0, per gli antigeni CD8 e CD4, con successivo raffreddamento graduale a temperatura ambiente;
 - 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 gli antigeni p53, p16, survivina, 8-OHdG e OGG1;
 - non è stato effettuato nessuno smascheramento antigenico per l'antigene HLA-DR;
 3. per la rivelazione dell' 8-OHdG, le sezioni sono state immerse in una soluzione di Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, EDTA 1mM, NaCl 0.4 mM, RNasi 100 µg/ml a 37 °C per 1h; per denaturare il DNA, le sezioni sono state

immerse in HCl 4 N a temperatura ambiente per 7 min e in seguito si è proceduto a neutralizzazione in una soluzione di Tris-base 50 mM a temperatura ambiente per 5 min;

4. incubazione in PBS al 10% di Normal Horse Serum (NHS) per gli anticorpi monoclonali e per la rivelazione dell'8-OHdG o Normal Goat Serum (NGS) per quelli policlonali, in camera umida a temperatura ambiente per 45 min;
5. 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-HMB45 umano (clone HMB45, Dako, Glostrup, Denmark) diluito 1:100;
 - Ab anti-Melan A umano (clone A103, Dako, Glostrup, Denmark) diluito 1:100;
 - Ab anti-CD8 umano (clone 1A5; Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, U.K.) diluito 1:50;
 - Ab anti-CD4 umano (clone 4B12; Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, U.K.) diluito 1:50;
 - Ab anti-HLA-DR umano (clone LN3, Clonab[®], Biotest, MI, Italia) diluito 1:5;
 - Ab anti-CD68 umano (clone PG-M1, Dako, Glostrup, Denmark) diluito 1:100;

- Ab anti-p53 umana (clone DO-7, Dako, Glostrup, Denmark) diluito 1:100;
 - Ab anti-p16^{INK4a} Ab-4 umana (clone 16P04, NeoMarkers, Fremont, CA, USA) diluito 1:100;
- b) incubazione con anticorpo primario policlonale di coniglio o di capra, per la rivelazione dell'8-OHdG (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-survivina umana (Novus Biologicals, Littleton, CO) diluito 1:2000;
 - Ab anti-8-OHdG umana (Chemicon International, Temecula, CA, USA) diluito 1:2000;
 - Ab anti-OGG1 umana (Novus Biologicals, Littleton, CO) diluito 1:100;
 - Ab anti-G6PD umana (Novus Biologicals, Littleton, CO) diluito 1:100;
6. 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;

7. incubazione con streptavidina alcalin-fosfatasi (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluita 1:1000 in PBS, in camera umida a temperatura ambiente per 30 min;
8. incubazione con Fast Red Substrate System (Dako, Glostrup, Denmark) o con Dako Fuchsin+ Substrate-Chromogen (Dako, Glostrup, Denmark), in camera umida a temperatura ambiente per 15-60 min;
9. controcolorazione con Ematossilina di Mayer 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. Controlli

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

Sezioni di tonsilla umana sono state utilizzate come controlli positivi per la rivelazione del CD8, CD4, HLA-DR, CD68 e OGG1. Sezioni di melanoma che hanno mostrato una forte espressione della p53, della p16, della survivina e dell'8-OHdG sono state utilizzate come controlli positivi per la rispettiva rivelazione degli stessi antigeni. Sezioni di parotide umana sono state utilizzate come controllo positivo per la rivelazione della G6PD.

2.6. Valutazione dell'immunoreattività

2.6.1. Infiltrato infiammatorio

La valutazione dei linfociti CD8 nel tumore è stata condotta con il seguente metodo:

- è stato identificato il fronte di invasione del tumore mediante l'utilizzo dei markers tumorali ed è stata tracciata una linea immaginaria che separasse l'area tumorale dal derma sottostante (Fig. 1A);
- campi microscopici adiacenti, al di sopra di questa linea immaginaria, sono stati osservati con ingrandimento 400x utilizzando un microscopio Zeiss AxioPhot2 (Carl Zeiss Vision GmbH, Hallbergmoos, Germania);
- in questo modo, abbiamo potuto osservare un'area tumorale che aveva per base la linea immaginaria precedentemente descritta e come altezza il diametro del campo microscopico (approssimativamente 600 μm);
- in ciascun campo microscopico i linfociti CD8 infiltranti il tumore sono stati contati, è stata calcolata la media dei conteggi effettuati nell'intera area tumorale e questo valore medio è stato utilizzato per l'analisi statistica. In base a questo valore, i pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi in base alla densità dei linfociti CD8 infiltranti il tumore e la sopravvivenza globale è

stata confrontata fra i gruppi di bassa (0-20 cellule), moderata (21-100 cellule) e alta (> 100 cellule) densità.

L'antigene CD4 era presente sui linfociti T helper come sui monociti e i macrofagi, localizzati nelle stesse aree tumorali. Questi diversi tipi di cellule si trovavano raggruppati tra loro per cui i limiti delle singole cellule non erano distinguibili; per questo motivo, non è stato possibile contare i linfociti CD4. Allo stesso modo, non si sono potute contare le cellule che presentavano gli antigeni HLA-DR e CD68 in quanto non era possibile distinguerle una ad una, soprattutto quando si presentavano pigmentate. Per questo si è proceduto classificando la densità di questi due tipi di cellule, alla base della fase di crescita verticale del tumore, come negativa (-), scarsa (+), moderata (++) o forte (+++). Una presenza negativa o scarsa è stata definita come “bassa”, mentre quella moderata o forte è stata definita “alta”, identificando così due gruppi di densità tra i quali è stata valutata la differenza di sopravvivenza globale.

2.6.2. Survivina

La survivina sembra avere una diversa funzione in base alla localizzazione cellulare (Li *et al*, 2005), per questo la sua immunoreattività è stata esaminata separatamente nel nucleo e nel citoplasma delle cellule tumorali e in

combinazione (survivina totale). L'intero tumore è stato osservato al microscopio per individuare le aree con maggiore attività mitotica ("mitotic hot-spots") (Carlson *et al*, 2005). In queste aree sono stati osservati almeno cinque campi microscopici con ingrandimento 400x; in ciascun campo sono state contate le cellule tumorali positive per la survivina nucleare o citoplasmatica ed è stato ottenuto un valore medio di cellule positive, nel nucleo o nel citoplasma, 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. I casi positivi per la survivina sono stati definiti "alterati", quelli negativi sono stati considerati "normali".

2.6.3. p53 e p16

In sezioni adiacenti degli stessi campioni sono stati osservati campi microscopici, corrispondenti a quelli valutati per la survivina, al fine di individuare le cellule positive alla p53 e alla p16. Per quanto riguarda l'espressione della p16, l'immunoreattività nucleare e citoplasmatica sono state valutate separatamente. La positività per la p53 (nucleare) e per la p16 (nucleare o citoplasmatica) è stata valutata in ciascun tumore osservando almeno cinque campi microscopici con ingrandimento 400x, considerando sia

l'intensità della colorazione che il numero medio di cellule positive: 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. Ognuno di questi due markers è stato definito "normale" o "alterato". I casi positivi per la p53 e quelli negativi per la p16 sono stati considerati "alterati", mentre tutti gli altri sono stati definiti "normali".

2.6.4. 8-OHdG, OGG1 e G6PD

L'intero tumore è stato osservato al microscopio per individuare le aree con maggiore attività mitotica ("mitotic hot-spots"); in queste aree sono stati osservati cinque campi microscopici con ingrandimento 400x e in questi sono state contate le cellule tumorali positive per l'8-OHdG. Allo stesso modo, aree tumorali corrispondenti, in sezioni adiacenti degli stessi campioni, sono state osservate per individuare e contare le cellule tumorali positive per l'OGG1, la G6PD, la p53 e la survivina nucleare, citoplasmatica o totale. La positività per i suddetti antigeni è stata valutata considerando sia il valore medio di cellule positive che l'intensità della colorazione immunoistochimica. I campioni sono stati considerati positivi quando più del 10% delle cellule tumorali presentavano una immunoreattività con intensità moderata o forte per i rispettivi antigeni.

2.7. Analisi statistica

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software SPSS (versione 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL USA). 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. Il tempo di sopravvivenza libero da recidiva durante i primi tre anni dalla diagnosi è stato calcolato dalla data di diagnosi alla data di comparsa della prima recidiva durante le visite di follow-up. I pazienti deceduti per altra causa o che hanno presentato recidiva dopo i tre anni sono stati censurati. Le analisi sono state stratificate per i fattori prognostici istopatologici ritenuti attualmente validi come lo spessore del tumore, il livello di Clark e lo stadio (in accordo con il sistema di stadiazione AJCC). Variabili clinico-patologiche, come il sesso, l'età, la localizzazione del tumore primario, il livello di invasione di Clark, lo spessore del tumore e l'invasione angio-linfatica, sono state correlate alla sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier. Le correlazioni tra le diverse variabili (p53, p16, survivina, 8-OHdG, OGG1, G6PD, variabili clinico-patologiche) sono state valutate con il test esatto di Fisher. Le analisi univariate e multivariate sono state condotte anche con il modello dei rischi

proporzionali di Cox ed il likelihood-ratio test. Sono stati riportati gli intervalli di confidenza del 95% (IC 95%) per la sopravvivenza. I risultati dell'analisi statistica sono stati considerati significativi per $P < 0.05$.

RISULTATI

3.1. Immunoistochimica

Tutti i tumori presi in considerazione hanno espresso almeno due marcatori specifici per il melanoma (Fig. 12).

3.1.1. Infiltrato infiammatorio

La distribuzione dei linfociti T citotossici CD8 infiltranti il tumore mostrava variabilità sia tra i diversi campioni che all'interno della stessa lesione (Fig. 13). Nel 49% dei campioni i linfociti CD8 infiltravano la base della fase di crescita verticale del tumore, in adiacenza al derma normale (Figg. 13A, 13B), nel 34% dei campioni si presentavano uniformemente distribuiti in tutto il tumore, mentre nel 17% non infiltravano il tumore. In alcuni campioni i linfociti CD8 infiltranti erano presenti nello stroma perinodulare all'interno della massa tumorale, ma non in adiacenza alle cellule tumorali (Fig. 13C); in altri casi erano presenti anche in stretta vicinanza alle cellule tumorali (Fig. 13D). In molti casi, in prossimità di questi linfociti, si trovavano cellule pigmentate con morfologia macrofagica (Fig. 13B). Solamente nei tumori con linfociti T CD8 infiltranti erano presenti rare cellule tumorali apoptotiche, sparse nella massa tumorale.

L'antigene CD4 marca sia linfociti T helper che monociti e macrofagi. Le cellule CD4 erano localizzate prevalentemente nello stroma intorno ai noduli

tumorali (Fig. 14A). Nella maggior parte dei tumori, i linfociti CD4 colocalizzavano con i linfociti CD8, nonostante fossero presenti in minor numero. Le cellule CD4 con morfologia macrofagica spesso si presentavano pigmentate e colocalizzavano con cellule che mostravano immunoreattività per il CD68 (Fig. 14B).

Le cellule positive per l'antigene HLA-DR erano numerose nella periferia del tumore adiacente al derma e gradualmente si distribuivano in tutta la massa tumorale (Fig. 15A), nei noduli tumorali e nello stroma intorno ad essi (Fig. 15B). Le cellule HLA-DR e i macrofagi CD68 mostravano una distribuzione simile nel tumore, nonostante le cellule HLA-DR fossero più numerose e mostrassero una colorazione più intensa.

3.1.2. Survivina, p53 e p16

L'immunoreattività per la survivina era presente sia nel nucleo che nel citoplasma delle cellule tumorali (survivina totale, Figg. 16A, 16B); in alcuni casi era prevalente l'espressione della survivina nucleare (Fig. 17A), con una immunoreattività citoplasmatica molto debole; in altri casi la survivina era presente esclusivamente nel citoplasma (Fig. 17B). In alcuni campioni, le cellule positive erano distribuite uniformemente in tutto il tumore, in altri mostravano una distribuzione eterogenea con gruppi di cellule positive e

negative. Nei casi di maggiore positività, si raggiungeva il 100% di cellule tumorali positive. I nucleoli (Fig. 18A) e le figure mitotiche, con la survivina localizzata nel fuso mitotico (Fig. 18B), risultavano spesso marcatamente colorati. I cheratinociti degli strati basali dell'epidermide, adiacente al tumore, mostravano immunoreattività per la survivina in prevalenza citoplasmatica, mentre i melanociti istologicamente normali erano negativi (Fig. 18C).

L'immunoreattività per la p53 era esclusivamente nucleare (Fig. 19) e, nella maggior parte dei casi, la distribuzione delle cellule positive era simile a quella delle cellule positive per la survivina nucleare. L'immunoreattività per la p16 era presente sia nel nucleo che nel citoplasma delle cellule tumorali (Figg. 20A, 20B). La distribuzione e il numero delle cellule positive, come anche l'intensità di colorazione, mostravano un'ampia variabilità. Nella maggior parte dei casi l'immunoreattività era più forte nel nucleo che nel citoplasma, mentre in pochi casi era presente esclusivamente nel citoplasma. In molti tumori, l'espressione della p16 era più marcata nel fronte di avanzamento del tumore (Fig. 20C). Le aree tumorali negative per la p16 erano spesso positive per la survivina.

3.1.3. 8-OHdG, OGG1 e G6PD

Nella maggior parte dei casi l'immunoreattività per l'8-OHdG era presente sia nel nucleo che nel citoplasma delle cellule tumorali (Fig. 21); in alcuni casi si presentava esclusivamente a livello nucleare e in altri solo a livello citoplasmatico; un caso era completamente negativo. Per quanto riguarda i fattori protettivi contro lo stress ossidativo, le cellule tumorali hanno mostrato un'intensa immunoreattività per l'OGG1 sia nel nucleo che nel citoplasma (Fig. 22); in alcuni casi la colorazione era esclusivamente nucleare, in altri esclusivamente citoplasmatica; alcuni campioni erano negativi. Le cellule positive per l'OGG1 erano distribuite uniformemente nel tumore (Fig. 22A) e mostravano una variabilità di colorazione da omogenea a granulare (Fig. 22B). La positività per la G6PD era presente esclusivamente a livello citoplasmatico (Fig. 23). Le cellule positive erano distribuite in tutto il tumore (Fig. 23A) e, mentre in alcuni casi mostravano un'intensità di colorazione omogenea, in altri alcune cellule mostravano una colorazione più forte rispetto alle altre (Figg. 23B, 23C). La positività per la p53 era confinata nel nucleo delle cellule, mentre la survivina era espressa sia nel nucleo che nel citoplasma, solo nel nucleo o solo nel citoplasma. Nella maggior parte dei casi, la distribuzione delle cellule positive per l'8-OHdG era simile a quella delle cellule positive per la p53 e per la survivina nucleare.

3.2. Analisi statistica

3.2.1. Infiltrato infiammatorio come fattore predittivo di sopravvivenza

La correlazione tra la densità di cellule CD8, HLA-DR e CD68 infiltranti il tumore e la probabilità di sopravvivenza post-chirurgica è stata determinata a 10 anni di follow up. La Figura 24 mostra la differenza tra le percentuali di sopravvivenza tra i pazienti con bassa (36.2% dei pazienti), media (42.5%) o alta (21.3%) densità di linfociti CD8 infiltranti. Secondo l'analisi statistica, la presenza dei linfociti CD8 infiltranti la base del tumore mostrava una correlazione positiva, statisticamente significativa, con la sopravvivenza (log-rank test, 8.49; $P = 0.0144$).

La presenza delle cellule HLA-DR nella periferia del tumore è stata classificata come negativa/scarsa (nel 25% dei pazienti) o media/alta (nel 75%) e l'analisi statistica ha mostrato che anche la presenza delle cellule HLA-DR infiltranti la base del tumore mostrava una correlazione positiva con la sopravvivenza (log-rank test, 5.29; $P = 0.0214$; Fig. 25). La Tabella 1 mostra i dati statistici dei gruppi di pazienti con diversa densità di cellule CD8 e HLA-DR e mostra le percentuali di mortalità di ogni gruppo riferite all'intero periodo di osservazione e ai 5 anni dalla data di diagnosi.

La densità delle cellule CD68 e la distribuzione dei pazienti secondo i parametri clinico-patologici sesso, età, localizzazione anatomica, livello di invasione di Clark, spessore del tumore e invasione angio-linfatica (Tab. 2) non hanno mostrato una correlazione significativa con la sopravvivenza ($P > 0.05$).

3.2.2. Survivina, p53 e p16 come fattori predittivi di sopravvivenza

L'analisi univariata di Kaplan-Meier ha mostrato che l'overespressione della survivina nucleare o della p53 e l'assenza della p16 nucleare, condizioni considerate "alterate", erano associate a un'aumentata mortalità per melanoma con una significatività di $P < 0.0001$, $P = 0.013$ e $P = 0.052$ (valore borderline), rispettivamente (Figg. 26A, B, C; Tab. 3). Il valore prognostico della survivina nucleare e della p53, ma non quello della p16 ($P = 0.06$), rimaneva significativo anche dopo aver stratificato l'analisi per fattori prognostici indipendenti ($P < 0.05$), come lo spessore del tumore, il livello di invasione di Clark e lo stadio. L'espressione della survivina citoplasmatica o della p16 citoplasmatica e le variabili clinico-patologiche considerate non hanno mostrato una correlazione significativa con la sopravvivenza ($P > 0.05$).

Poiché l'espressione della survivina nucleare, della p53 e della p16 nucleare ha mostrato valore prognostico, è stato analizzato il valore prognostico di questi markers in combinazione. La Tabella 4 mostra l'associazione tra il numero di markers "alterati" (nessuno, uno, due o tutti e tre) e le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti; lo spessore del tumore, il livello di Clark e lo stadio hanno mostrato una correlazione significativa con il numero di markers alterati. L'analisi univariata di Kaplan-Meier ha mostrato che il rischio di mortalità per melanoma aumentava progressivamente con l'aumentare del numero dei markers alterati ($P < 0.0001$; Fig. 27) e, secondo l'analisi multivariata, questo valore prognostico si manteneva anche stratificando l'analisi per lo spessore del tumore, il livello di Clark e lo stadio ($P < 0.05$). L'analisi univariata e multivariata è stata condotta anche utilizzando il modello dei rischi proporzionali di Cox e i risultati sono mostrati in Tabella 5.

3.2.3. Survivina come fattore predittivo di recidiva

L'analisi di Kaplan-Meier ha mostrato che i pazienti che presentavano immunoreattività per la survivina nucleare nelle cellule tumorali avevano un tempo di sopravvivenza libero da recidiva ridotto rispetto ai pazienti senza l'espressione della survivina nucleare nelle cellule tumorali ($P = 0.0052$; Fig.

28). Questo valore prognostico ha mantenuto significatività anche dopo aver stratificato l'analisi per lo spessore del tumore, il livello di Clark e lo stadio ($P = 0.017$; $P = 0.025$; $P = 0.033$). Quando è stato considerato il tempo di sopravvivenza libero da recidiva durante i primi tre anni dalla diagnosi (Tab. 6), la survivina nucleare ha mantenuto il suo valore prognostico, aumentando il rischio di recidiva ($P = 0.0014$), anche dopo aver stratificato l'analisi per lo spessore, il livello di Clark e lo stadio ($P = 0.0089$; $P = 0.014$; $P = 0.019$). L'analisi univariata e multivariata è stata condotta anche utilizzando il modello dei rischi proporzionali di Cox e i risultati sono riportati in Tabella 7. L'immunoreattività per la survivina citoplasmatica non ha mostrato alcuna correlazione con il rischio di recidiva. L'associazione tra le variabili clinico-patologiche e il tempo di sopravvivenza libero da recidiva durante i primi tre anni dalla diagnosi è riportata in Tabella 6.

3.2.4. Espressione della survivina in relazione a quella della p53 e della p16

L'analisi statistica, condotta mediante il test esatto di Fisher, ha mostrato che l'espressione della survivina totale era significativamente più alta nel gruppo dei melanomi positivi per la p53, piuttosto che in quelli negativi ($P = 0.012$). Quando l'espressione nucleare e citoplasmatica della survivina sono state

analizzate separatamente, si è notata una correlazione significativa soltanto tra l'espressione della survivina nucleare e della p53 ($P = 0.001$). Non è stata osservata alcuna correlazione tra l'espressione della survivina (nucleare, citoplasmatica o totale) e quella della p16 (Tab. 8). L'espressione della survivina totale era significativamente associata allo spessore del tumore, allo stadio e alla localizzazione anatomica e la significatività di questa associazione era maggiore se si considerava esclusivamente la survivina nucleare, la cui espressione era correlata anche al livello di invasione di Clark. L'espressione della p53 era associata allo spessore del tumore e al livello di invasione di Clark. Per contro, nessuna correlazione è stata trovata tra le variabili clinico-patologiche prese in considerazione e la survivina citoplasmatica, né con la p16 sia nucleare che citoplasmatica (Tab. 9).

3.2.5. Espressione dell'8-OHdG in relazione a quella dell'OGG1, della G6PD, della p53 e della survivina

L'espressione dell'8-OHdG nei nuclei delle cellule tumorali era più frequente nei casi positivi per la p53 e per la survivina; infatti il test esatto di Fisher ha mostrato che l'espressione dell'8-OHdG nel nucleo era significativamente associata all'espressione della p53 ($P = 0.021$) e della survivina nucleare ($P = 0.002$; Tab. 10). Non è stata trovata nessuna correlazione tra la survivina

citoplasmatica e l'8-OHdG. Quando la survivina nucleare e citoplasmatica sono state esaminate in combinazione, hanno mostrato un'associazione significativa con l'8-OHdG nucleare ($P = 0.036$). I nostri dati non hanno mostrato nessuna correlazione tra l'espressione dell'8-OHdG e dell'OGG1 o della G6PD ($P > 0.05$; Tab. 11).

DISCUSSIONE

Il nuovo sistema di stadiazione dell'AJCC, tra i potenziali biomarkers prognostici, considera validi solo lo spessore del tumore, l'ulcerazione, i satelliti e lo stato linfonodale (Balch *et al*, 2004; Balch, 2002). Nelle indagini da noi condotte, tuttavia, variabili cliniche come lo spessore del tumore, il livello di Clark, l'invasione angio-linfatica, il sesso, l'età e la localizzazione del tumore primario non hanno mostrato una correlazione statisticamente significativa con la sopravvivenza, probabilmente a causa del basso numero di pazienti via via presi in esame.

La trasformazione maligna può essere associata con l'espressione di particolari molecole nelle cellule tumorali, riconosciute come estranee dal sistema immune e che possono indurre una risposta immunitaria capace di modulare il potenziale metastatico delle neoplasie, compreso il melanoma cutaneo. Diversi studi hanno mostrato che la presenza di un infiltrato immunitario in alcuni tumori, come il melanoma, è associata ad una prognosi migliore rispetto a tumori simili dal punto di vista istopatologico, ma che non presentano un infiltrato immunitario (Abbas *et al*, 1997). La fase di crescita verticale del tumore (VGP) rappresenta un cambiamento qualitativo nella biologia del melanoma: è stato infatti mostrato che la VGP può significare l'inizio dell'evoluzione del tumore verso la fase metastatica. Spesso, nella VGP, i noduli tumorali sono associati a linfociti T infiltranti (TILs), tuttavia

in minor numero rispetto alla fase di crescita radiale. La densità e il pattern di distribuzione dei linfociti T nell'ambito del tumore sono stati classificati come: brisk, non-brisk e absent, e sono stati considerati fra i più affidabili parametri istopatologici con valore prognostico (Clark *et al*, 1989; Clemente *et al*, 1996; Tuthill *et al*, 2002). Il ruolo centrale dei linfociti T nella risposta immunitaria antitumorale è ben conosciuto e le cellule effettrici con attività antitumorale sono in predominanza linfociti T citotossici (CD8). In questo studio, abbiamo voluto valutare la presenza e il numero dei linfociti T infiltranti il tumore, tipizzandoli in citotossici (CD8) o helper (CD4), come possibile fattore istopatologico prognostico nei melanomi di stadio I e II, senza quindi metastasi al momento della diagnosi. La localizzazione dei TILs CD8 nel melanoma era simile a quella dei linfociti infiltranti descritta da Clemente (Clemente *et al*, 1996): in alcuni campioni, i linfociti CD8 infiltravano la base della VGP del tumore, in adiacenza al derma normale; in altri campioni, i linfociti CD8 erano diffusi in tutto il tumore; in pochi campioni, i linfociti CD8 non erano presenti. Una differenza significativa in termini di sopravvivenza ai 5 anni esisteva tra i gruppi di pazienti con alta, media o bassa densità di linfociti CD8 infiltranti, indipendentemente dalle altre variabili cliniche. Questi risultati suggeriscono che la presenza dei TILs CD8 può essere considerata un importante fattore prognostico indipendente in

melanomi di stadio I e II (Piras *et al*, 2005). La presenza di un'alta densità di linfociti CD8 aumenta significativamente la probabilità di sopravvivenza e porta ad una migliore prognosi, confermando l'attività antitumorale dei linfociti T citotossici nel melanoma. I nostri risultati confermano quelli di Clark che, per la prima volta nel 1989 (Clark *et al*, 1989), ha individuato l'importanza dei TILs nella prognosi di pazienti con melanoma, e sono simili a quelli pubblicati da Clemente (Clemente *et al*, 1996) in termini di differenze di sopravvivenza ai 5 anni tra le categorie di TILs brisk, non-brisk e absent. I linfociti T sono mediatori critici dell'immunità antitumorale attraverso l'attività combinata dei linfociti T citotossici (CD8) e T helper (CD4); in questo contesto, l'attività antitumorale dei linfociti T citotossici può dipendere in parte dai segnali forniti dalle cellule T helper. All'interno dei tumori è stata spesso osservata una colocalizzazione dei linfociti CD4 e CD8 (Bernsen *et al*, 2004), nonostante i linfociti CD4 fossero presenti in minor numero. Tuttavia, essendo l'antigene CD4 comune ai linfociti, ai monociti e ai macrofagi, le cellule CD4 non sono state contate e il loro conteggio non si è potuto utilizzare come un valido approccio per valutare se queste cellule possano rappresentare un parametro prognostico. I linfociti CD4 riconoscono gli antigeni tumorali in associazione con le molecole HLA-II, espresse dai linfociti B attivati, dai macrofagi e dalle cellule dendritiche che interagiscono

con gli antigeni tumorali per i processi di fagocitosi, processazione e attivazione delle cellule T-helper. Mediante la determinazione dell'antigene HLA-DR, abbiamo inoltre valutato la presenza e la densità delle cellule presentanti l'antigene e abbiamo potuto osservare che la loro presenza era correlata significativamente con una migliore prognosi. Alla luce di questi risultati, si possono confermare precedenti studi (Riley, 2004) secondo i quali gli antigeni tumorali vengono riconosciuti dai linfociti solo se presentati adeguatamente ed il successo della risposta immunitaria dipende dalla mediazione delle cellule presentanti l'antigene. L'antigene HLA-DR è anche un marker per un sottogruppo di precursori delle cellule dendritiche, le cellule dendritiche plasmacitoidi (P-DCs) (Farkas *et al*, 2001), un aumento delle quali è stato precedentemente riscontrato nelle aree peritumorali di melanomi primari (Vermi *et al*, 2003). Le P-DCs sono specializzate nella produzione di interferone di tipo I (Salio *et al*, 2003), rappresentando probabilmente un meccanismo immunologico che limita la diffusione del melanoma. Per questo motivo, anche un'alta densità di cellule HLA-DR infiltranti la base del tumore può apparire come un fattore prognostico favorevole in melanomi di stadio I e II (Piras *et al*, 2005), visto il ruolo che queste cellule svolgono come iniziatori della risposta immunitaria, cellule presentanti l'antigene e che producono l'interferone.

Numerosi studi hanno mostrato che i macrofagi CD68 infiltranti il tumore contribuiscono alla determinazione della prognosi e sono associati alla densità microvascolare (Torisu-Itakura *et al*, 2000; Makitie *et al*, 2001; Ladanyi, 2004). Tuttavia, i risultati del nostro studio riguardo la presenza e la densità delle cellule CD68 non hanno mostrato nessuna correlazione con la sopravvivenza e sarebbero utili ulteriori studi per chiarire il coinvolgimento dei macrofagi nella risposta immunitaria al melanoma.

Tra i potenziali fattori prognostici, alcuni studi hanno dimostrato che la survivina nucleare o citoplasmatica è un marker prognostico sfavorevole in diversi tumori, mentre altri studi hanno descritto la survivina nucleare o citoplasmatica come fattore prognostico favorevole (Altieri and Marchisio, 1999; Xie *et al*, 2006; Ponnelle *et al*, 2005). Nel melanoma cutaneo l'espressione della survivina è stata associata con l'insorgenza e la progressione del tumore (Grossman *et al*, 1999; Alonso *et al*, 2004; Ding *et al*, 2006). La sua overespressione è stata studiata come fattore prognostico in linfonodi sentinella provenienti da pazienti con melanoma e in melanomi metastatici di stadio IV ed è stata trovata significativamente correlata con una prognosi peggiore (Gradilone *et al*, 2003; Takeuchi *et al*, 2005). Tuttavia, in questi studi non è stato definito il compartimento subcellulare nel quale la survivina era espressa. Poiché il valore prognostico ed il ruolo svolto dalla

survivina sembra dipendere dal compartimento nel quale è presente, nel nostro studio è stata data particolare enfasi alla sua localizzazione. I nostri risultati indicano che la presenza della survivina nel nucleo delle cellule di melanoma primario di stadio I e II, rivelata immunohistochimicamente, è significativamente associata a una ridotta sopravvivenza ed esiste una differenza significativa di sopravvivenza ai 5 anni tra pazienti con un'alta o una bassa espressione di survivina nucleare. Inoltre, il rischio di recidiva risulta maggiore, soprattutto nei primi tre anni della fase post-operatoria, per i pazienti che presentano tumori con survivina nucleare piuttosto che per quelli in cui la survivina non è rilevabile (Piras *et al*, 2007). L'analisi mediante il modello dei rischi proporzionali di Cox ha mostrato che l'espressione della survivina nucleare è un fattore prognostico indipendente e porta a un rischio sei volte maggiore di sviluppare recidiva nei primi tre anni dalla diagnosi. Al contrario, l'espressione citoplasmatica della survivina non è risultata correlata con la sopravvivenza, con il rischio di recidiva nè con gli altri fattori prognostici. Pertanto, l'espressione nucleare della survivina costituisce un importante marker di rischio di recidiva e di sopravvivenza, indipendentemente da altri fattori. Nel nucleo la survivina sembra svolgere un ruolo nella divisione cellulare attraverso la sua associazione con la chinasi Aurora B, la proteina INCENP e la proteina Borealin/Dasra B sul

centromero/cinetocoro dei cromosomi per formare il “chromosomal passenger complex” (Honda *et al*, 2003; Li, 2003). Alcuni studi sul carcinoma epatocellulare hanno mostrato che la survivina interagisce con la chinasi Cdk4 (Ito *et al*, 2000) e questa interazione porta alla traslocazione della survivina nel nucleo (Suzuki *et al*, 2000). L’overespressione della survivina porta a una riduzione della fase G0/G1 e ad un aumento della fase S. La traslocazione della survivina nel nucleo coincide con il passaggio alla fase S e se si impedisce il suo trasferimento al nucleo questo passaggio non avviene (Suzuki *et al*, 2000). In base a questi risultati, la traslocazione della survivina nel nucleo potrebbe rappresentare un prerequisito per la proliferazione delle cellule tumorali, mentre la survivina citoplasmatica si potrebbe associare alla sopravvivenza ma non alla proliferazione cellulare (Altieri and Marchisio, 1999). Pertanto, una forte espressione della survivina nel nucleo può rappresentare un aumento degli eventi mitotici.

Uno splicing alternativo del trascritto genico della survivina produce diversi mRNA che codificano per diverse proteine. Attualmente, sono note cinque varianti della survivina che sembrano avere diverse localizzazioni subcellulari e funzioni: la survivina, survivina-2 α , survivina-2B, survivina-3B e survivina- Δ Ex3 (Mahotka *et al*, 1999; Mahotka *et al*, 2002; Badran *et al*, 2004; Caldas *et al*, 2005). La survivina-2B è localizzata nel citoplasma, precisamente nei

mitocondri (Li and Ling, 2006; Mahotka *et al*, 2002), mentre la survivina- Δ Ex3 si trova nel nucleo (Mahotka *et al*, 2002; Caldas *et al*, 2005). La survivina-2 α interagisce e colocalizza con la survivina nei centromeri dei cromosomi in divisione, mentre la localizzazione e la funzione della survivina-3B non sono ancora ben chiare. E' stato ipotizzato che un'interazione tra la survivina e le varianti 2B, Δ Ex3 e 2 α possa modulare il suo ruolo nel controllo della mitosi e/o dell'apoptosi (Li, 2003; Caldas *et al*, 2005). Noton e collaboratori (Noton *et al*, 2005) hanno suggerito che l'espressione della survivina-2B possa avere un'azione citotossica, in accordo con un recente studio secondo cui questa variante inibisce la crescita delle cellule tumorali nel polmone e induce apoptosi (Ling *et al*, 2005). Così come studi sull'adenocarcinoma rettale hanno mostrato come un alto rapporto survivina-2B/survivina correli con una migliore prognosi, altri studi hanno suggerito un ruolo negativo della survivina-2B nella progressione del tumore. Il pool mitocondriale della survivina nelle cellule tumorali sembra essere essenziale per l'inibizione dell'apoptosi mediata dai mitocondri (Dohi *et al*, 2004) e probabilmente la survivina-2B è capace di indurre l'apoptosi bloccando il rilascio della survivina dai mitocondri al citosol mediante un'interazione fisica. In questo studio è stato utilizzato un anticorpo policlonale ottenuto utilizzando come immunogeno una survivina

ricombinante umana full-length, che probabilmente riconosce non solo la survivina ma tutte le sue varianti. Per tale motivo, i nostri risultati rappresenterebbero l'espressione combinata di tutte queste varianti. L'immunoreattività citoplasmatica potrebbe rappresentare l'espressione combinata della survivina e della survivina-2B che, avendo effetti opposti sull'apoptosi, potrebbero spiegare la mancanza di valore prognostico per l'immunoreattività citoplasmatica. Alti livelli di survivina- Δ Ex3 sono associati a rischio di mortalità e recidiva in pazienti con tumore non a piccole cellule del polmone (Ling *et al*, 2005). Song and Wu (Song and Wu, 2005) hanno dimostrato che la survivina- Δ Ex3, a differenza della survivina, è localizzata nel nucleolo, dove va incontro a rapida degradazione; questa localizzazione e degradazione sembrano essere necessarie per la sua funzione anti-apoptotica. L'immunoreattività nucleolare che è stata osservata nel nostro studio potrebbe essere associata all'espressione della survivina- Δ Ex3.

E' stato dimostrato che le cellule tumorali resistono alla morte programmata mediante un'espressione alterata di proteine pro-apoptotiche come di quelle anti-apoptotiche e mediante la perdita dei geni soppressori tumorali, eludendo in questo modo i meccanismi di regolazione interna e acquisendo un fenotipo invasivo. La survivina e la p53 hanno un ruolo centrale nella regolazione dell'apoptosi e la p16, che inibisce la proliferazione cellulare, è coinvolta nei

meccanismi associati all'insorgenza dei tumori. Il meccanismo della up-regulation della survivina nei tumori è tuttora compreso solo in parte. La survivina è debolmente espressa nelle cellule normali in rapida divisione in un modo dipendente dal ciclo cellulare (Yang *et al*, 2004), mentre altri meccanismi non dipendenti dal ciclo cellulare, che possono portare alla trascrizione del gene della survivina indipendentemente dalla mitosi, sono stati proposti come fondamentali nei tumori (Altieri, 2006). Questo potrebbe spiegare l'overespressione della survivina in quasi tutti i tumori indipendentemente dalla periodicità del ciclo cellulare (Altieri, 2003). Recentemente, è stato mostrato che un fattore trascrizionale come la p53 può regolare l'espressione della survivina nelle cellule di diversi tumori umani (Mirza *et al*, 2002; Hoffman *et al*, 2002). La p53 sembra essere in grado di reprimere la trascrizione del gene della survivina legandosi direttamente ad un elemento presente nella sequenza promoter della survivina. E' possibile che la p53 agisca da sola o in combinazione con altre proteine come E2F, un attivatore della trascrizione, o sin3 e HDAC (Istone deacetilasi), repressori della trascrizione. Questi ultimi fattori hanno affinità per la p53 e possono formare un complesso per legarsi alla sequenza promoter della survivina e reprimerne la trascrizione (Sah *et al*, 2006). L'accumulo della proteina p53 nelle cellule tumorali, che permette la sua identificazione con metodiche

immunoistochimiche, è stato considerato un marker di mutazione della p53, dal momento che la p53 wild-type (non mutata) generalmente non si evidenzia immunoistochimicamente a causa della sua breve emivita (Hall and Lane, 1994). Tuttavia, è noto che la positività per la p53 può riflettere sia un'alterazione del gene o anche una stabilizzazione aberrante della proteina wild-type. In numerosi studi sul melanoma sono state trovate rare o assenti mutazioni puntiformi della TP53 (Tumor Protein 53) (Chin, 2003). D'altra parte, un ruolo della p53 nella patogenesi del melanoma è stato suggerito da Mintz e collaboratori, che hanno mostrato come l'antigene T dell'SV40 (Simian Virus 40), che inattiva sia la proteina RB che la p53, generi un fenotipo di melanoma particolarmente infiltrante e aggressivo (Bradl *et al*, 1991). Dal momento che la p53 può essere un fattore inibitore della trascrizione della survivina, una perdita funzionale della p53, per alterazione del gene o per stabilizzazione aberrante della proteina wild-type, può essere responsabile di una up-regulation della survivina nel melanoma. Anche in altri tumori, come il carcinoma gastrico, pancreatico, prostatico, polmonare, epidermoide e laringeo a cellule squamose, è stata riscontrata una correlazione tra l'accumulo della p53 e l'espressione della survivina (Sah *et al*, 2006; Pizem *et al*, 2004). I nostri risultati mostrano un'associazione significativa tra l'espressione della survivina e della p53 anche nel melanoma.

La significatività di questa associazione risulta maggiore quando viene presa in esame separatamente la survivina nucleare, mentre non si ottiene alcuna correlazione considerando quella citoplasmatica. Ulteriori studi permetterebbero di far luce sui complessi meccanismi di interazione tra la survivina e la p53. L'espressione ubiquitaria della survivina e il cambiamento della sua localizzazione subcellulare durante il ciclo cellulare sono stati riportati in uno studio di Suzuki. E' stato dimostrato che l'overespressione della survivina porta ad un accelerato passaggio alla fase S e che questa fase coincide con la sua traslocazione nel nucleo. E' stata inoltre suggerita un'interazione competitiva tra la survivina e la p16. La survivina infatti può interagire competitivamente con la p16, rimuovendola dal complesso Cdk4/p16^{INK4a}; questa interazione porta alla traslocazione della survivina nel nucleo. Il complesso risultante Cdk4/survivina attiva, a sua volta, il complesso Cdk2/ciclina E, portando alla fosforilazione della proteina Rb e alla progressione della fase S del ciclo cellulare (Suzuki *et al*, 2000).

Recentemente, è stata riscontrata nel carcinoma a cellule squamose della laringe una relazione tra l'espressione della survivina e della p16 (Zhu *et al*, 2004). Alla luce di questi risultati, abbiamo esaminato l'espressione della survivina in rapporto a quella della p16 nel nucleo e nel citoplasma delle cellule di melanoma in aree corrispondenti, senza tuttavia aver riscontrato una

correlazione significativa tra l'espressione di queste proteine. I markers molecolari hanno la potenzialità di identificare i pazienti a maggior rischio di progressione del tumore. Precedenti studi su melanomi cutanei di stadio I hanno suggerito che l'aumento dell'espressione della p53 possa essere associato con la proliferazione delle cellule tumorali e lo spessore del tumore (Vogt *et al*, 1997; Karjalainen *et al*, 1999). Anche nel nostro studio l'espressione della p53 e della survivina nucleare in melanomi di stadio I e II è risultata significativamente associata allo spessore del tumore, al livello di Clark e allo stadio. L'associazione tra questi markers molecolari e lo spessore del tumore o il livello di Clark non dovrebbe sorprendere in quanto essi riflettono il grado di proliferazione cellulare, un processo che rappresenta l'equilibrio tra la nascita e la morte della cellula, che viene condizionato dall'attività di proteine mitotiche overesprese, come la survivina nucleare, e dalla perdita funzionale di proteine apoptotiche, come la p53. Nonostante caratteristiche patologiche come lo spessore del tumore, il livello di Clark e lo stadio siano state precedentemente descritte come fattori prognostici validi, la capacità di un marker molecolare di predire la sopravvivenza indipendentemente da questi fattori è di grande importanza per la scelta della terapia. Nel nostro studio, l'analisi multivariata ha mostrato che un'espressione alterata della p53, della survivina e della p16 risultava

associata ad una ridotta sopravvivenza anche dopo aver stratificato l'analisi per i sopraindicati fattori prognostici. Inoltre, il numero di markers regolatori del ciclo cellulare contemporaneamente alterati risulta importante come indicatore prognostico. La p53 e la survivina, non soltanto sono coinvolte nei meccanismi in cui interagiscono, ma hanno anche ruoli indipendenti nella regolazione dell'apoptosi; come conseguenza, per giungere all'inibizione dell'apoptosi è necessario che diversi meccanismi siano alterati. Il valore prognostico della survivina nucleare sembra associato al suo ruolo nel promuovere la proliferazione cellulare piuttosto che nel controllo della sopravvivenza della cellula.

E' noto che la p16 nucleare ha un effetto inibitore sulla progressione del ciclo cellulare e che le sue alterazioni o la sua perdita siano associate ad una maggiore aggressività dei tumori e ad una ridotta sopravvivenza in pazienti con melanoma (Straume *et al*, 2000; Sirigu *et al*, 2006). Le nostre indagini hanno dimostrato che questi tre markers molecolari hanno, in pazienti con melanoma, un maggiore valore prognostico se studiati in combinazione piuttosto che singolarmente. L'analisi statistica, mediante il modello dei rischi proporzionali di Cox, ha infatti dimostrato che l'alterazione di tutti e tre i markers è un fattore prognostico indipendente e porta ad un rischio di mortalità per melanoma quattro volte maggiore. Per contro, i pazienti che non

presentavano questi markers alterati mostravano tassi di sopravvivenza più alti, pertanto tali pazienti potrebbero evitare terapie aggressive non necessarie. Allo stesso tempo, i pazienti con una peggiore prognosi perchè con tutti i markers alterati potrebbero beneficiare di trattamenti precoci ancorchè aggressivi.

Alcuni studi relativi all'esposizione dei tessuti a fattori che inducono stress ossidativo, evidenziato con alti livelli di 8-OHdG, hanno riscontrato una concomitante overespressione della p53 (Palozza *et al*, 2004; Kim *et al*, 2005). Le radiazioni UV, così come inducono un danno ossidativo al DNA, rivelabile da un aumento dell'espressione dell'8-OHdG nelle cellule, allo stesso modo potrebbero causare mutazioni in geni come la p53. In altri studi, transversioni G→T (G:C→T:A), indotte dalla presenza dell'8-OHdG durante la replicazione del DNA, sono state ritrovate nel gene della p53 (Tsai *et al*, 2005). Si pensa che tali mutazioni portino a un'augmentata stabilità della proteina e permettano così una sua più facile rivelazione con metodiche immunoistochimiche. Nel nostro studio, l'overespressione della p53 risulta coesistente con un'intensa espressione dell'8-OHdG e della survivina nucleare, suggerendo che il danno ossidativo al DNA, la perdita funzionale della p53 e l'overespressione della survivina nucleare possano essere fattori simultaneamente coinvolti nella patogenesi del melanoma. In uno studio sul

melanoma, è stato suggerito che il rischio di sviluppo e di trasformazione maligna di nevi atipici possa aumentare significativamente come conseguenza di una carenza dell'enzima G6PD, che porta ad un aumento del danno ossidativo nel DNA dei melanociti, allorquando sia associata a delezione omozigote del gene della p16 (Pavel *et al*, 2003). I nostri dati preliminari non hanno mostrato una correlazione significativa tra l'espressione dell'8-OHdG e della G6PD. Altre indagini hanno suggerito che alti livelli di 8-OHdG inducono l'espressione dell'OGG1 e che la ridotta attività di questo enzima è associata ad un aumentato rischio di tumore, a causa di una mancata riparazione dei danni ossidativi al DNA. Tali dati non sono stati confermati dai nostri risultati, che non hanno rilevato un'associazione significativa tra l'espressione dell'8-OHdG e quella dell'OGG1, similmente a quanto emerso da uno studio sul tumore della mammella, in cui alti livelli di 8-OHdG non erano associati alla mancanza del gene di riparazione *hOGG1* (Li *et al*, 2001). Dal momento che l'alterazione dell'equilibrio ossidazione/riduzione nelle cellule è stata considerata un importante fattore per l'insorgenza e la progressione dei tumori, riteniamo necessari ulteriori studi per fare maggiore chiarezza sul ruolo dell'8-OHdG e degli enzimi G6PD e OGG1 nello stress ossidativo cui sono sottoposte le cellule di melanoma.

CONCLUSIONI

L'intento principale di questa attività di ricerca è stato, come premesso, l'individuazione di marcatori molecolari prognostici precoci nel melanoma. Nell'ambito della risposta immunitaria normalmente presente, abbiamo individuato nei linfociti CD8 e nelle cellule HLA-DR non solo un ruolo come effettori dell'attività antitumorale, ma anche un possibile utilizzo come markers prognostici precoci. Fra le proteine coinvolte nella regolazione dell'apoptosi, della proliferazione cellulare e del ciclo cellulare, la survivina nucleare, la p53 e la p16 nucleare secondo i nostri risultati possono essere considerate markers prognostici individuali validi, tuttavia la loro combinazione appare ancora più efficace nel predire con maggiore accuratezza la prognosi dei pazienti con melanoma. Pertanto, la valutazione dello status dei markers in relazione a meccanismi di carcinogenesi, come la deregolazione dell'apoptosi e del ciclo cellulare, e di risposta immunitaria antitumorale potrebbe contribuire all'identificazione dei pazienti eleggibili per terapie adiuvanti (farmacologiche, chirurgiche, molecolari) e inoltre, alla scelta della terapia, poiché lo status di questi markers appare associato alla patogenesi e alla progressione del melanoma.

BIBLIOGRAFIA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (1997) Cellular and molecular immunology, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company
- Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC (1998) Developmentally regulated expression of the novel cancer antiapoptosis gene survivin in human and mouse differentiation *Am J Pathol*; 152:43–9
- Aitchison TC, Sirel JM, Watt DC, MacKie RM (1995) Prognostic trees to aid prognosis in patients with cutaneous malignant melanoma. Scottish Melanoma Group *BMJ*; 311:1536–9
- Alonso SR, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gómez B, Sánchez L, Acuña MJ, Pajares R, Martínez-Tello FJ, Hortelano CM, Piris MA, Rodríguez-Peralto JL (2004) Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study *Am J Pathol*; 164:193–203
- Altieri DC, Marchisio PC (1999) Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer *Lab Invest*; 79:1327-33
- Altieri DC (2003) Validating survivin as a cancer therapeutic target *Nat Rev Cancer*; 3:46–54

- Altieri DC (2006) The case for Survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions *Curr Opin Cell Biol*; 18:609-15
- Arai K, Morishita K, Shinmura K, Kohno T, Kim S-R, Nohmi T, Taniwaki S, Ohwada S and Yokota J (1997) Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage *Oncogene*; 14:2857-61
- Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T, Inuzuka M (2004) Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin *Biochem Biophys Res Commun*; 314:902-7
- Balch CM, Soong SJ, Murad TM, Ingalls AL, Maddox WA (1979) A multifactorial analysis of melanoma. II. Prognostic factors in patients with stage I (localized) melanoma *Surgery*; 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 (2001a) Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging System *J Clin Oncol*; 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 (2001b) Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma *J Clin Oncol*; 19(16):3635-48

- Balch CM (2002) 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; 209-17
- 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 (2004) An evidence-based staging system for cutaneous melanoma *CA Cancer J Clin*; 54:131-49
- Barnhill RL, Lugassy C (2004) Angiotropic malignant melanoma and extravascular migratory metastasis: description of 36 cases with emphasis on a new mechanism of tumour spread *Pathology*; 36:485–90
- Bataille V (2003) Genetic epidemiology of melanoma *Eur J Cancer*; 39:1341-7
- Bernsen MR, Diepstra JH, van Mil P, Punt CJ, Figdor CG, van Muijen GN, Adema GJ, Ruiter DJ (2004) Presence and localization of T-cell subsets in relation to melanocyte differentiation antigen expression and tumour regression as assessed by immunohistochemistry and molecular analysis of microdissected T cells *J Pathol*; 202:70-9

- Bjelland S, Seeberg E (2003) Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation *Mutat Res*; 531:37-80
- Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE (2000) Controversies on the prognostic significance of tumor infiltrating leukocytes in solid human tumors *Anticancer Res*; 20:1759–68
- Borgstein PJ, Meijer S, Van Diest PJ (1999) Are locoregional cutaneous metastases in melanoma predictable? *Ann Surg Oncol*; 6:315–21
- Boring CC, Squires TS, Tong T (1991) Cancer statistics *Bol Asoc Med PR*; 83:225-42
- Bradl M, Klein-Szanto A, Porter S, Mintz B (1991) Malignant melanoma in transgenic mice *Proc Natl Acad Sci*; 88:164-8
- Breslow A (1970) Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma *Ann Surg*; 172:902–8
- Busam KJ, Antonescu CR, Marghoob AA (2001) Histologic classification of tumor-infiltrating lymphocytes in primary cutaneous malignant melanoma *Am J Clin Pathol*; 115:856–60
- Caldas H, Honsey LE, Altura RA (2005) Survivin 2alpha: a novel survivin splice variant expressed in human malignancies *Mol Cancer*; 4:11

- Carlson JA, Ross J, Murphy M (2005) Markers of high-risk cutaneous melanoma: is there a winning combination for individualized prognosis? *J Cutan Pathol*; 32:700-3
- Cheng ML, Ho HY, Wu YH, Chiu DT (2004) Glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient cells show an increased propensity for oxidant-induced senescence *Free radic Biol Med*; 36(5):580-91
- Chin L (2003) The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man *Nat Rev Cancer*; 3:559-70
- Clark WH Jr (1967) 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. New York: Pergamon Press: 621–47
- Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC (1989) Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression *J Natl Cancer Inst*; 81:1893–904
- Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurrada S, Collini P, Cascinelli N (1996) Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma *Cancer*; 77:1303–10
- Cook MG (1992) The significance of inflammation and regression in melanoma *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*; 420:113–5

- Cummins DL, Cummins JM, Pantle H, Silverman MA, Leonard AL, Chanmugam A, MBA (2006) Cutaneous Malignant Melanoma *Mayo Clin Proc*; 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 (2005) Distinct sets of genetic alterations in melanoma *N Engl J Med*; 353(20):2135-47
- 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 (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer *Nature*; 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 (1981) Malignant melanoma. Prognostic significance of “microscopic satellites” in the reticular dermis and subcutaneous fat *Ann Surg*; 194:108–12

- Dickman PW, Hakulinen T, Luostarinen T, Pukkala E, Sankila R, Söderman B, Teppo L (1999) Survival of cancer patients in Finland 1955-1994. *Acta Oncol*; 38 Suppl 12:1-103
- Ding Y, Prieto VG, Zhang PS, Rosenthal S, Smith KJ, Skelton HG, Diwan AH (2006) Nuclear expression of the antiapoptotic protein survivin in malignant melanoma *Cancer*; 106: 1123-9
- Dissanayake SK, Thompson JA, Bosch JJ, Clements VK, Chen PW, Ksander BR, Ostrand-Rosenberg S (2004) Activation of tumor-specific CD4(+) T lymphocytes by major histocompatibility complex Class II tumor cell vaccines: a novel cell-based immunotherapy *Cancer Res*; 64:1867–74
- Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC (2004) Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis *J Clin Invest*; 114:1117-27
- Elder DE, Gimotty PA, Guerry D (2005) Cutaneous melanoma: estimating survival and recurrence risk based on histopathologic features *Dermatol Ther*; 18(5):369-85
- Elwood JM, Jopson J (1997) Melanoma and sun exposure: an overview of published studies *Int J Cancer*; 73:198-203
- Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, Jahnsen FL (2001) Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon-alpha/beta-producing

cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions *Am J Pathol*; 159:237-43

- Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC (2002) Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function *J Cell Sci*; 115:575–85
- Gassmann R, Carvalho A, Henzing AJ, Ruchaud S, Hudson DF, Honda R, Nigg EA, Gerloff DL, Earnshaw WC (2004) Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle *J Cell Biol*; 166:179-91
- Giglia-Mari G, Sarasin A (2003) TP53 mutations in human skin cancers *Hum Mutat*; 21:217-28
- Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, Gorbisky GJ, Tognin S, Marchisio PC, Symons M, Altieri DC (2002) Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin *Cancer Res*; 62: 2462–7
- Goldstein and Tucker (2005) A Piece of the Melanoma Puzzle *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 97, No. 20, 1486-7
- Gradilone A, Gazzaniga P, Ribuffo D, Scarpa S, Cigna E, Vasaturo F, Bottoni U, Innocenzi D, Calvieri S, Scuderi N, Frati L, Aglianò AM (2003)

Survivin, bcl-2, bax, and bcl-X gene expression in sentinel lymph nodes from melanoma patients *J Clin Oncol*; 21:306-12

- Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC (1999) Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma *J Invest Dermatol*; 113:1076-81
- Hakansson A, Gustafsson B, Krysander L, Hakansson L (1996) Tumour-infiltrating lymphocytes in metastatic malignant melanoma and response to interferon alpha treatment *Br J Cancer*; 74:670–6
- Hakansson A, Gustafsson B, Krysander L, Hakansson L (1998) Effect of IFN-alpha on tumor-infiltrating mononuclear cells and regressive changes in metastatic malignant melanoma *J Interferon Cytokine Res*; 18:33–9
- Hakansson A, Gustafsson B, Krysander L, Hjelmqvist B, Rettrup B, Hakansson L (2001) Biochemotherapy of metastatic malignant melanoma. Predictive value of tumour-infiltrating lymphocytes *Br J Cancer*; 85:1871–7
- Håkansson A, Håkansson L, Gustafsson B (2003) On the effect of biochemotherapy in metastatic malignant melanoma: an immunopathological evaluation *Melanoma Res*; 13:401–7
- Hall PA, Lane DP (1994) p53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry?—Revisited! *J Pathol*; 172:1–4

- Haluska FG (2006) Genetic alterations in melanoma; implications for therapy Scientific Symposium. Proc. ASCO '06
- Haluska FG, Tsao H, Wu H, Haluska FS, Lazar A, Goel V (2006) Genetic alterations in signaling pathways in melanoma *Clin Cancer Res*; 12(7 Pt 2):2301s-2307s
- Henriksen T, Dahlback A, Larsen SH, Moan J (1990) Ultraviolet-radiation and skin cancer: effect of an ozone layer depletion *Photochem Photobiol*; 51:579-82
- Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M (2002) Transcriptional repression of the anti-apoptotic Survivin gene wild type p53 *J Biol Chem*; 277:3247-57
- Holly EA, Aston DA, Cress RD, Ahn DK, Kristiansen JJ (1995) Cutaneous melanoma in women, I: exposure to sunlight, ability to tan, and other risk factors related to ultraviolet light *Am J Epidemiol*; 141:923-33
- Honda R, Korner R, Nigg EA (2003) Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis *Mol Biol Cell*; 14:3325-41
- Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A (2000)

Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma
Hepatology; 31:1080-5

- 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 (1994) Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus *Nat Genet*; 8(1):23-6
- Karjalainen JM, Eskelinen MJ, Kellokoski JK, Reinikainen M, Alhava EM, Kosma VM (1999) p21(WAF1/CIP1) expression in stage I cutaneous malignant melanoma: its relationship with p53, cell proliferation and survival *Br J Cancer*; 79:895-902
- Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, Nosrati M, Miller JR III (2001) Vascular involvement in the prognosis of primary cutaneous melanoma *Arch Dermatol*; 137:1169–73
- Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, Nosrati M, Miller JR III (2002) Tumor vascularity in the prognostic assessment of primary cutaneous melanoma *J Clin Oncol*; 20:1826–31
- Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N (1998) Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer *Cancer Res*; 58:5071–4

- Kim SY, Kim DS, Kwon SB, Park ES, Huh CH, Youn SW, Kim SW, Park KC (2005) Protective effects of EGCG on UVB-induced damage in living skin equivalents *Arch Pharm Res*; 28:784-90
- Konstadoulakis MM, Vezeridis M, Hatziyianni E, Karakousis CP, Cole B, Bland KI, Wanebo HJ (1998) Molecular oncogene markers and their significance in cutaneous malignant melanoma *Ann Surg Oncol*; 5:253–60
- Ladanyi A (2004) Function and prognostic significance of immune cells infiltrating human tumors *Magy Onkol*; 48:49-56
- Levine AJ (1997) *p53*, the cellular gatekeeper for growth and division *Cell*; 88:323
- Lew RA, Sober AJ, Cook N, Marvell R, Fitzpatrick TB (1983) Sun exposure habits in patients with cutaneous melanoma: a case control study *J Dermatol Surg Oncol*; 9:981-6
- Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC (1998) Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin *Nature*; 396:580-4
- Li D, Zhang W, Zhu J, Chang P, Sahin A, Singletary E, Bondy M, Hazra T, Mitra S, Lau SS, Shen J, DiGiovanni J (2001) Oxidative DNA

damage and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine DNA glycosylase/apurinic lyase in human breast cancer *Mol Carcinog*; 31(4):214-23

- Li F (2003) Survivin study: what is the next wave? *J Cell Physiol*; 197:8–29
- Li F, Yang J, Ramnath N, Javle MM, Tan D (2005) Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? *Int. J Cancer*; 114:509-12
- Li F, Ling X (2006) Survivin study. An update of "What is the Next Wave?" *J Cell Physiol*; 208:476-86
- Ling X, Yang J, Tan D, Ramnath N, Younis T, Bundy BN, Slocum HK, Yang L, Zhou M, Li F (2005) Differential expression of survivin-2B and survivin-DeltaEx3 is inversely associated with disease relapse and patient survival in non-small-cell lung cancer (NSCLC) *Lung Cancer*; 49:353-61
- Luzzatto L, Battistuzzi G (1985) Glucose-6-phosphate dehydrogenase *Adv Hum Genet*; 14:217-329,386-8
- Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD (1999) Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties *Cancer Res*; 59:6097–102

- Mahotka C, Liebmann J, Wenzel M, Suschek CV, Schmitt M, Gabbert HE, Gerharz CD (2002) Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants *Cell Death Differ*; 9:1334-42
- Makitie T, Summanen P, Tarkkanen A, Kivela T (2001) Tumor infiltrating macrophages (CD68(+) cells) and prognosis in malignant uveal melanoma *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 42:1414-21
- Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, Ono T, Albertson DG, Pinkel D, Bastian BC (2003) Determinants of BRAF mutations in primary melanomas *J Natl Cancer Inst*; 95(24):1878-90
- Mihm MC Jr, Clemente CG, Cascinelli N (1996) Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response *Lab Invest*; 74:43-7
- Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, Wen SF, Wang L, Kirschmeier P, Bishop WR, Nielsen LL, Pickett CB, Liu S (2002) Human Survivin is negatively regulated by wild type p53 and participate in p53-dependent apoptotic pathway *Oncogene*; 21:2613-22
- Mukunyadzi P, Huang H, Liu K, Fan CY (2003) Concomitant loss of mitochondria and the DNA repair protein hOGG1 in clear cell carcinoma of the kidney *Appl Immunohistochem Mol Morphol*; 11(4):334-8

- Noton EA, Colnaghi R, Tate S, Starck C, Carvalho A, Ko Ferrigno P, Wheatley SP (2005) Molecular analysis of survivin isoforms: evidence that alternatively spliced variants do not play a role in mitosis *J Biol Chem*; 281:1286-95
- Obata C, Zhang M, Moroi Y, Hisaeda H, Tanaka K, Murata S, Furue M, Himeno K (2004) Formalin-fixed tumor cells effectively induce antitumor immunity both in prophylactic and therapeutic conditions *J Dermatol Sci*; 34:209–19
- Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E (2004) The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression *J Med Invest*; 51:146-53
- Olie RA, Simões-Wüst AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U (2000) A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy *Cancer Res*; 60:2805-9
- Oliveria SA, Saraiya M, Geller AC, Heneghan MK and Jorgensen C (2006) Sun exposure and risk of melanoma *Arch Dis Child*; 91:131–8
- Osterlind A, Tucker MA, Stone BJ, Jensen OM (1988) The Danish case-control study of cutaneous malignant melanoma, II: importance of UV-light exposure *Int J Cancer*; 42:319-24

- Palozza P, Serini S, Di Nicuolo F, Boninsegna A, Torsello A, Maggiano N, Ranelletti FO, Wolf FI, Calviello G, Cittadini A (2004) beta-Carotene exacerbates DNA oxidative damage and modifies p53-related pathways of cell proliferation and apoptosis in cultured cells exposed to tobacco smoke condensate *Carcinogenesis*; 25:1315-25
- Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB, eds. (2003) Cancer incidence in five continents, Vol. VIII. Lyon, France: IARC Press
- Pavel S, Smit NP, van der Meulen H, Kolb RM, de Groot AJ, van der Velden PA, Gruis NA, Bergman W (2003) Homozygous germline mutation of CDKN2A/p16 and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in a multiple melanoma case *Melanoma Res*; 13(2):171-8
- Piras F, Colombari R, Minerba L, Murtas D, Floris C, Maxia C, Corbu A, Perra MT, Sirigu P (2005) Predictive value of CD8, CD4, CD68, and HLA-DR cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase *Cancer*; 104(6):1246-54
- Piras F, Murtas D, Minerba L Ugalde J, Floris C, Maxia C, Colombari R, Perra MT, Sirigu P (2007) Nuclear Survivin is associated with disease recurrence and poor survival in patients with cutaneous malignant melanoma *Histopathology*; 50:835-42

- Pizem J, Cör A, Gale N (2004) Survivin expression is a negative prognostic marker in laryngeal squamous cell carcinoma and is associated with p53 accumulation *Histopathology*; 45:180-6
- Ponnelle T, Chapusot C, Martin L, Bouvier AM, Plenchette S, Faivre J, Solary E, Piard F (2005) Cellular localisation of survivin: impact on the prognosis in colorectal cancer *J Cancer Res Clin Oncol*; 131:504-10
- Qiang L, Yi J, Fu-De C (2004) Melanoma vaccine based on the vector of membrane fusogenic liposomes *Pharmazie*; 59:263–7
- Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Mariotto A, Feuer EJ, Edwards BK, editors. (2004) 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]
- Riley PA (2004) Melanoma and the problem of malignancy *Tohoku J Exp Med*; 204:1-9
- Ronan SG, Han MC, Das Gupta TK (1988) Histologic prognostic indicators in cutaneous malignant melanoma *Semin Oncol*; 15:558–65
- Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS (2006) Structural, functional and therapeutic biology of Survivin *Cancer Lett*; 244:164-71

- Salio M, Cella M, Vermi W, Facchetti F, Palmowski MJ, Smith CL, Shepherd D, Colonna M, Cerundolo V (2003) Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions *Eur J Immunol*; 33:1052-62
- Salvesen GS, Duckett CS (2002) Apoptosis: IAP proteins: blocking the road to death's road *Nat Rev Mol Cell Biol*; 3:401–10
- Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ (2004) Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis *Int J Dermatol*; 43(5):326-35
- Schuchter L, Schultz DJ, Synnestvedt M, Trock BJ, Guerry D, Elder DE, Elenitsas R, Clark WH, Halpern AC (1996) A prognostic model for predicting 10-year survival in patients with primary melanoma. The Pigmented Lesion Group *Ann Intern Med*; 125:369-75
- Shaw HM, Balch CM, Soong SJ, Milton GW, McCarthy WH (1985) Prognostic histopathological factors in malignant melanoma *Pathology*; 17 271–4
- Shen J, Deininger P, Hunt JD, Zhao H (2007) 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) as a potential survival biomarker in patients with nonsmall-cell lung cancer *Cancer*; 109(3):574-80

- Sherr CJ (1994) The ins and outs of RB: coupling gene expression to the cell cycle clock *Trends Cell Biol*; 4(1):15-8
- Sirigu P, Piras F, Minerba L, Murtas D, Maxia C, Colombari R, Corbu A, Perra MT, Ugalde J (2006) Prognostic prediction of the immunohistochemical expression of p16 and p53 in cutaneous melanoma: a comparison of two populations from different geographical regions *Eur J Histochem*; 50:191-8
- Song Z, Wu M (2005) Identification of a novel nucleolar localization signal and a degradation signal in survivin-deltaEx3: a potential link between nucleolus and protein degradation *Oncogene*; 24:2723-34
- Steenken S, Jovanovic SV (1997) How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution *J Am Chem Soc* 119:617-8
- Straume O, Sviland L, Akslen LA (2000) Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma *Clin Cancer Res*; 6:1845-53
- Suzuki A, Hayashida M, Ito T, Kawano H, Nakano T, Miura M, Akahane K, Shiraki K (2000) Survivin initiates cell cycle entry by the competitive interaction with Cdk4/p16(INK4a) and Cdk2/cyclin E complex activation *Oncogene*; 19:3225-34

- Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC (1999) Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer *N Engl J Med*; 341:452-3
- Takeuchi H, Morton DL, Elashoff D, Hoon DS (2005) Survivin expression by metastatic melanoma predicts poor disease outcome in patients receiving adjuvant polyvalent vaccine *Int J Cancer*; 117:1032-8
- The World Health Organization (2005) The World Health Organization recommends that no person under 18 should use a sunbed. WHO Media Centre. Available from: www.who.int/mediacentre/news/notes/np07/en/
- Torisu-Itakura H, Furue M, Kuwano M, Ono M (2000) Co-expression of thymidine phosphorylase and heme oxygenase-1 in macrophages in human malignant vertical growth melanomas *Jpn J Cancer Res*; 91:906–10
- Tsai YY, Cheng YW, Lee H, Tsai FJ, Tseng SH, Chang KC (2005) P53 gene mutation spectrum and the relationship between gene mutation and protein levels in pterygium *Mol Vis*; 11:50-5
- Tsao H, Zhang X, Fowlkes K, Haluska FG (2000) Relative reciprocity of NRAS and PTEN/MMAC1 alterations in cutaneous melanoma cell lines *Cancer Res*; 60(7):1800-4

- Tuthill RJ, Unger JM, Liu PY, Flaherty LE, Sondak VK (2002) 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*; 4:504–11
- Vermi W, Bonecchi R, Facchetti F, Bianchi D, Sozzani S, Festa S, Berenzi A, Cella M, Colonna M (2003) Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas *J Pathol*; 200:255-68
- Vogt T, Zipperer KH, Vogt A, Hölzel D, Landthaler M, Stolz W (1997) p53-protein and Ki-67-antigen expression are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of the skin *Histopathology*; 30:57-63
- Vong QP, Cao K, Li HY, Iglesias PA, Zheng Y (2005) Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin *Science* 310(5753):1499-504
- Wallace SS (2002) Biological consequences of free radical-damaged DNA bases *Free Rad Biol Med*; 33:1-14
- Wheatley SP, McNeish IA (2005) Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis *Int Rev Cytol*; 247:35-88

- Whiteman D, Green A (1994) Melanoma and sunburn *Cancer Causes Control*; 5:564-572
- Xie D, Zeng YX, Wang HJ, Wen JM, Tao Y, Sham JS, Guan XY (2006) Expression of cytoplasmic and nuclear survivin in primary and secondary human glioblastoma *Br J Cancer*; 94:108-14
- Yang D, Welm A, Bishop JM (2004) Cell division and cell survival in the absence of Survivin *Pro Natl Acad Sci*; 101:15100-5
- Zaffaroni N, Pennati M, Colella G, Perego P, Supino R, Gatti L, Pilotti S, Zunino F, Daidone MG (2002) Expression of the antiapoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer *Cell Mol Life Sci*; 59:1406-12
- Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG (2005) Survivin as a target for new anticancer interventions *J Cell Mol Med*; 9:360-72
- Zangemeister-Wittke U, Simon HU (2004) An IAP in action; the multiple roles of Survivin in differentiation, immunity and malignancy *Cell Cycle*; 3:1121-3
- Zehntner S, Townsend W, Parkes J, Schmidt C, Down M, Bell J, Mulligan R, O'Rourke M, Ellem K, Thomas R (1999) Tumor metastasis biopsy as a surrogate marker of response to melanoma immunotherapy *Pathology*; 31:116-22

- Zhu J, Xu RJ, Wu ZH, Yan CL, Cao XL, Fang Y, Lin L (2004)
Expression of survivin gene and its relationship with expression of p15, p16
proteins in laryngeal squamous cell carcinomas *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke
Za Zhi*; 39:356-9

ATTIVITÀ SVOLTA DURANTE IL DOTTORATO DI RICERCA ED ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI

L'attività, durante il Dottorato di Ricerca, è stata condotta non solo nell'ambito del melanoma cutaneo umano, ma anche di una lesione degenerativa congiuntivale, come lo pterigio, e dei sistemi sensoriali dei cetacei odontoceti.

Le indagini svolte hanno contribuito all'elaborazione di lavori scientifici pubblicati su riviste internazionali e presentati a Congressi nazionali ed internazionali.

(I lavori *in extenso* sono contrassegnati da un asterisco)

- MAXIA C., MAGGIANI F., **MURTAS D.**, LIXIA A., CRNJAR R., SIRIGU P.

Taste structures in dolphins (Odontocetes): a morphologic and functional study

58° Congresso Nazionale della Società Italiana di Anatomia, Chieti, 2004

The Italian Journal of Anatomy and Embriology, Firenze, July-September 2004, 109(suppl. 1): 292

- PIRAS F., MINERBA L., **MURTAS D.**, MAXIA C., MULAS P., CORBU A., PERRA M.T., SIRIGU P.

Prognostic value of immune system infiltrating cells in human skin melanoma

58° Congresso Nazionale della Società Italiana di Anatomia, Chieti, 2004

The Italian Journal of Anatomy and Embriology, Firenze, July-September 2004, 109(suppl. 1): 316

- CRNJAR R., LISCIA A.M., MAGGIANI F., MASALA C., MAXIA C., **MURTAS D.**, SIRIGU P.

Morphofunctional reports of taste in Cetaceans (Odontocetes)

XVI Ecro Congress, Centre Européen des Sciences du Goût, Dijon, 2004
September 12-15

- PIRAS F., MINERBA L., **MURTAS D.**, MAXIA C., MULAS P., CORBU A., PERRA M.T., UGALDE J., SIRIGU P.

Human cutaneous malignant melanoma: prognostic value of immune system infiltrating cells

Proceedings of the 31st National Congress of the Italian Society of Histochemistry, Pisa, 2005

European Journal of Histochemistry, Pavia, 2005 June 15-17, 49(suppl. 1): 15

➤ MAXIA C., MAGGIANI F., PIRAS F., **MURTAS D.**, SCANO P.
Extramandibular fat bodies of the striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*): a morphological and ¹³C NMR study
Proceedings of the 31st National Congress of the Italian Society of Histochemistry, Pisa, 2005
European Journal of Histochemistry, Pavia, 2005 June 15-17, 49(suppl. 1): 15

➤ *PIRAS F., COLOMBARI R., MINERBA L., **MURTAS D.**, FLORIS C., MAXIA C., CORBU A., PERRA M.T., SIRIGU P.
Predictive Value of CD8, CD4, CD68, and HLA-DR Cells in the Prognosis of Cutaneous Malignant Melanoma with Vertical Growth Phase Cancer, Hoboken, NJ, USA, 2005 Sep 15; 104(6): 1246-54

➤ CORBU A., MAXIA C., PIRAS F., **MURTAS D.**, DEMURTAS P., ZUCCA I., SIRIGU P., PERRA M.T.
Oxidative stress in pterygium
59° Congresso Nazionale della Società Italiana di Anatomia e Istologia, Sorrento, 2005
The Italian Journal of Anatomy and Embryology, Firenze, July-September 2005; 110(suppl. 1): 185

➤ MAXIA C., MAGGIANI F., PIRAS F., **MURTAS D.**, SCANO P.
Morphological and multinuclear NMR characterization of the extramandibular fat bodies of the striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*)
59° Congresso Nazionale della Società Italiana di Anatomia e Istologia, Sorrento, 2005
The Italian Journal of Anatomy and Embryology, Firenze, July-September 2005; 110(suppl. 1): 186

➤ PIRAS F., **MURTAS D.**, MINERBA L., DEMURTAS P., MULAS P., MAXIA C., CORBU A.
Expression of the survivin, inhibitor protein of apoptosis, in cutaneous malignant melanoma: immunohistochemical study

59° Congresso Nazionale della Società Italiana di Anatomia e Istologia, Sorrento, 2005

The Italian Journal of Anatomy and Embryology, Firenze, July-September 2005; 110(suppl. 1): 223

➤ *SIRIGU P., PIRAS F., MINERBA L., **MURTAS D.**, MAXIA C., MULAS P., CORBU A., PERRA M.T. UGALDE J.

Prognostic prediction of the immunohistochemical expression of p16 and p53 in cutaneous malignant melanoma: a comparison of two populations from different geographical regions

European Journal of Histochemistry, Pavia, 2006 Jul-Sep; 50(3): 191-198

➤ PERRA M.T., MAXIA C., CORBU A., MINERBA L., DEMURTAS P., COLOMBARI R., **MURTAS D.**, ZUCCA I., BRAVO S., PIRAS F., SIRIGU P.

Oxidative DNA damage and the relationship between p53 and 8-OHdG in pterygium

60° Congresso Nazionale della Società Italiana di Anatomia e Istologia, Pavia, 2006

The Italian Journal of Anatomy and Embryology, Firenze, July-September 2006; 111(suppl. 2): 205

➤ PIRAS F., **MURTAS D.**, MINERBA L., UGALDE J., FLORIS C., MAXIA C., COLOMBARI R., DEMURTAS P., VINTIMILLA R., PERRA M.T., SIRIGU P.

Expression of survivin, p53, and p16 proteins in cutaneous malignant melanoma: an immunohistochemical study

60° Congresso Nazionale della Società Italiana di Anatomia e Istologia, Pavia, 2006

The Italian Journal of Anatomy and Embryology, Firenze, July-September 2006; 111(suppl. 2): 207

➤ PIRAS F., **MURTAS D.**, MINERBA L., UGALDE J., FLORIS C., MAXIA C., COLOMBARI R., DEMURTAS P., VINTIMILLA R., PERRA M.T., SIRIGU P.

The predictive value of survivin expression profile in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase

60° Congresso Nazionale della Società Italiana di Anatomia e Istologia, Pavia, 2006

The Italian Journal of Anatomy and Embryology, Firenze, July-September 2006; 111(suppl. 2): 208

- *PERRA M.T., MAXIA C., CORBU A., MINERBA L., DEMURTAS P., COLOMBARI R., **MURTAS D.**, BRAVO S., PIRAS F., SIRIGU P.

Oxidative stress in pterygium: relationship between p53 and 8-hydroxydeoxyguanosine

Molecular Vision, Atlanta, GA, USA, 2006 Sep 30; 12: 1136-1142

- PIRAS F., **MURTAS D.**, MINERBA L., FLORIS C., MAXIA C., DEMURTAS P., PERRA M.T., SIRIGU P.

Expression of survivin, mitotic regulator and inhibitor of apoptosis, and the transcription factor p53 in cutaneous malignant melanoma

The 2007 UK Chromatin meeting, University of Nottingham, 2007 April 12-13. Abstract book.

- *PIRAS F., **MURTAS D.**, MINERBA L., UGALDE J., FLORIS C., MAXIA C., COLOMBARI R., PERRA M.T., SIRIGU P.

Nuclear survivin is associated with disease recurrence and poor survival in patients with cutaneous malignant melanoma

Histopathology, Oxford, UK, 2007 Jun; 50: 835-842

- *RIBATTI D., NICO B., MAXIA C., LONGO V., **MURTAS D.**, MANGIERI D., PERRA M.T., DE GIORGIS M., PIRAS F., CRIVELLATO E., SIRIGU P.

Neovascularization and mast cells with tryptase activity increase simultaneously in human pterygium

Journal of Cellular and Molecular Medicine, Bucharest, Romania, 2007 May-Jun; 11(3): 585-589

- PERRA M.T., MAXIA C., CORBU A., MINERBA L., DEMURTAS P., **MURTAS D.**, ZUCCA I., PIRAS F., SIRIGU P.

Oxidative stress and apoptosis markers in pterygium: immunohistochemical study

Proceedings of the 32nd National Congress of the Italian Society of Histochemistry, Messina, 2007

European Journal of Histochemistry, Pavia, 2007 May 31-June 2;

51(suppl. 2): 15

- PIRAS F., **MURTAS D.**, MINERBA L., MAXIA C., FLORIS C., DEMURTAS P., PERRA M.T., SIRIGU P.

Apoptotic and anti-apoptotic proteins in cutaneous malignant melanoma
Proceedings of the 32nd National Congress of the Italian Society of Histochemistry, Messina, 2007

European Journal of Histochemistry, Pavia, 2007 May 31-June 2; 51(suppl. 2): 16

- *MAXIA C., SCANO P., MAGGIANI F., **MURTAS D.**, PIRAS F., CRNJAR R., LAI A., SIRIGU P.

A morphological and ¹³C NMR study of the extramandibular fat bodies of the striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*)

The Anatomical Record, Hoboken, USA, 2007 Jul; 290(7): 913-919

- DEMURTAS P., PERRA M.T., MAXIA C., CORBU A., MINERBA L., **MURTAS D.**, CARPIO D., COLOMBARI R., PIRAS F., SIRIGU P.

Expression of survivin protein and its relationship with oxidative DNA damage in pterygium

61° Congresso Nazionale della Società Italiana di Anatomia e Istologia, Sassari, 2007

The Italian Journal of Anatomy and Embryology, Firenze, April-June 2007; 112(suppl. 1): 97

- **MURTAS D.**, PIRAS F., MINERBA L., UGALDE J., FLORIS C., MAXIA C., DEMURTAS P., VINTIMILLA R., PERRA M.T., SIRIGU P.

Oxidative DNA damage and apoptotic or anti-apoptotic factors in cutaneous melanoma

61° Congresso Nazionale della Società Italiana di Anatomia e Istologia, Sassari, 2007

The Italian Journal of Anatomy and Embryology, Firenze, April-June 2007; 112(suppl. 1): 192

- *MAXIA C., PERRA M.T., DEMURTAS P., MINERBA L., **MURTAS D.**, PIRAS F., CORBU A., CARPIO GOTUZZO D., CABRERA R., RIBATTI D., SIRIGU P.

Expression of survivin protein in pterygium and relationship with oxidative DNA damage

Journal of Cellular and Molecular Medicine, Bucharest, Romania, submitted 2007 Sept

➤ **MURTAS D.**, PIRAS F., MINERBA L., UGALDE J., FLORIS C., MAXIA C., DEMURTAS P., VINTIMILLA R., PERRA M.T., SIRIGU P.

Oxidative stress and its relationship with p53 and survivin proteins in cutaneous malignant melanoma

Pigment Cell Research, Special Melanoma Issue, December 2007; 20(6): 567

2007 International Melanoma Congress, New York

➤ PIRAS F., **MURTAS D.**, MINERBA L., UGALDE J., FLORIS C., MAXIA C., DEMURTAS P., VINTIMILLA R., PERRA M.T., SIRIGU P.

Apoptosis-related factors and immune system cells in cutaneous malignant melanoma

Pigment Cell Research, Special Melanoma Issue, December 2007; 20(6): 569-570

2007 International Melanoma Congress, New York

➤ *PIRAS F., PERRA M.T., **MURTAS D.**, MINERBA L., FLORIS C., MAXIA C., DEMURTAS P., UGALDE J., RIBATTI D., SIRIGU P.

Combinations of apoptosis and cell-cycle control biomarkers predict the outcome of human melanoma

Cancer Letters, Oxford, UK, submitted 2007 Dec

TABELLE

Tabella 1. Dati statistici dei gruppi di pazienti con diversa densità di cellule CD8 e HLA-DR

Gruppi di pazienti	Range	N° pazienti	N° eventi	Censurati (%)	Mesi sopravvivenza (mediana)	% mortalità	% sopravvivenza (ES)
TILs CD8							
Bassa densità	0-20	17	13	23.5	18	81	25 (10.8)
Media densità	21-100	20	11	45	30.6	55	44.4 (11.2)
Alta densità	> 100	10	2	80	77	20	78.8 (13.4)
Totale		47	26	44.7	36.7	56.5	43.9 (7.6)
Cellule HLA-DR							
Bassa densità	-/+	10	8	20	26	80	0.0
Alta densità	++/+++	30	15	50	72	50	50.9 (9.4)
Totale		40	23	42.5	30	57.5	45.8 (7.6)

ES: errore standard; TILs: linfociti infiltranti il tumore; cellule HLA-DR: human leukocyte antigen-D-related cells; -: negativa; +: scarsa; ++: media; +++: alta densità.

Tabella 2. Analisi delle variabili clinico-patologiche dei pazienti come fattori predittivi di sopravvivenza

Variabili	N° pazienti	N° eventi	Censurati (%)	% sopravvivenza ai 5 anni	ES (%)	P^a
Sesso						0.89
Maschi	22	12	45.45	49.2	10.8	
Femmine	25	15	40	42	10.4	
Età						0.75
< 61 anni ^b	23	13	43.48	39.5	11.1	
≥ 61 anni	24	14	41.67	50	10.2	
Localizzazione anatomica						0.84
Testa e collo	18	11	38.89	43.2	11.9	
Tronco	10	5	50	50	15.8	
Arti	19	11	42.11	45.1	12	
Livello di Clark						0.79
II, III	12	7	41.67	41.7	14.2	
IV, V	35	20	42.86	47.1	8.7	
Spessore						0.24
T1, T2	16	8	50	50	12.5	
T3, T4	31	19	38.71	43.5	9.2	
Invasione angio-linfatica						0.18
Presente	17	12	29	35	11.5	
Assente	30	15	50	50	9.7	
Totale	47	27	42.55	45.2	7.5	

ES: errore standard; ^alog-rank test; ^bmediana.

Tabella 3. Analisi della sopravvivenza nucleare, della p53 e della p16 nucleare come fattori predittivi di sopravvivenza

	N° pazienti	N° eventi	% sopravvivenza	ES (%)	P ^a
Survivina nucleare					< 0.0001
Negativi	27	2	91.8	5.5	
Positivi	37	10	46.5	11.8	
p53					0.013
Negativi	30	4	84.6	7.1	
Positivi	34	8	54.9	12.0	
p16 nucleare					0.052
Negativi	30	8	59.6	11.3	
Positivi	34	4	83.3	7.6	

ES: errore standard; ^alog-rank test.

Tabella 4. Associazione tra il numero di markers (survivina nucleare, p53, p16 nucleare) “alterati” e le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti

Variabili	N° pazienti	N° markers alterati				P ^a
		0	1	2	3	
Totale	68	9	25	14		
Sesso						0.165
Maschi	30	1	12	8	9	
Femmine	38	8	13	6	11	
Età						0.236
≥ 67 ^b	26	6	19	7	10	
< 67	42	3	6	7	10	
Spessore						0.003
T1, T2	28	8	12	3	5	
T3, T4	40	1	13	11	15	
Livello di Clark						0.010
II, III	26	7	12	3	4	
IV, V	42	2	13	11	16	
Stadio						0.005
IA, IB,	27	8	11	3	5	
IIA, IIB, IIC	41	1	14	11	15	
Localizzazione anatomica						0.274
Testa e collo	14	1	8	3	2	
Tronco	16	4	7	1	4	
Arti superiori	11	0	4	3	4	
Arti inferiori	27	4	6	7	10	

^aTest esatto di Fisher; ^bmediana.

Tabella 5. Analisi univariata e multivariata della sopravvivenza nucleare, della p53 e della p16 nucleare come fattori predittivi di sopravvivenza

	Survivina nucleare	p53	p16 nucleare	Markers combinati
	HR	HR	HR	HR
	(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)
	P^a	P^a	P^a	P^a
Analisi univariata				
	9,67	4,07	0,32	4,52
	(2.1-44.5)	(1.22-13.58)	(0.097-1.077)	(2.26-9.01)
	0.004	0.022	0.066	< 0.0001
Analisi multivariata^b				
Spessore	9,37	3,70	0,36	4,77
T1, T2 vs	(1.80-48.63)	(1.09-12.52)	(0.11-1.22)	(2.14-10.59)
T3, T4	0.008	0.035	0.10	< 0.0001
Livello di Clark	9,50	3,83	0,35	4,77
II, III vs	(1.87-48.33)	(1.14-12.88)	(0.10-1.17)	(2.16-10.57)
IV+V	0.007	0.030	0.088	< 0.0001
Stadio	9,60	3,68	0,36	4,75
IA, IB vs	(1.85-49.84)	(1.09-12.44)	(0.11-1.23)	(2.14-10.55)
IIA, IIB, IIC	0.007	0.036	0.104	< 0.0001

HR: Hazard ratio; IC: intervallo di confidenza; ^amodello dei rischi proporzionali di Cox; ^banalisi stratificata per lo spessore, il livello di Clark e lo stadio.

Tabella 6. Analisi univariata della sopravvivenza e delle variabili clinico-patologiche come fattori predittivi di recidiva entro i primi tre anni dalla diagnosi e di sopravvivenza ai 5 anni

Variabili	N° pazienti	% sopravvivenza libera da recidiva entro i tre anni dalla diagnosi (IC 95%)	P^a	% sopravvivenza ai 5 anni (IC 95%)	P^a
Totale	50	79.9 (68.9-91)		72.7 (60.4-85.1)	
Survivina nucleare			0.0014		0.0019
Positivi	18	55 (32-78)		53.3 (30.3-76.3)	
Negativi	32	93.7 (85.8-100)		90.4 (80.2-100)	
Survivina citoplasmatica			0.64		0.38
Positivi	23	82.6 (67.1-98.1)		82.6 (67.1-98.1)	
Negativi	27	78 (62.2-93.6)		72.9 (56.1-89.6)	
Sesso			0.98		0.68
Femmine	30	80 (65.7-94.3)		80 (65.7-94.3)	
Maschi	20	80 (62.5-97.5)		73.3 (53.9-92.7)	
Età			0.93		0.73
< 58 ^b	25	80 (64.3-95.7)		80 (64.3-95.7)	
≥ 58	25	79.8 (64.1-95.5)		74.9 (57.9-91.9)	
Localizzazione anatomica			0.79		0.68
Testa e collo	14	85.7 (67.4-100)		85.7 (67.4-100)	
Tronco	14	78.6 (57-100)		71.4 (47.7-95.1)	
Arti	22	77 (59.4-94.6)		76.6 (58.9-94.3)	
Spessore			0.097		0.15
T1, T2	31	87.1 (75.3-98.9)		83.9 (70.9-96.8)	
T3, T4	19	68 (47-89)		67.1 (46-88.2)	
Livello di Clark			0.042		0.072
II, III	29	89.7 (78.6-100)		86.2 (73.7-98.8)	
IV, V	21	66.3 (46.1-86.5)		65.3 (45-85.7)	
Stadio			0.027		0.047
IA, IB	30	90 (79.3-100)		86.7 (74.5-98.8)	
IIA, IIB, IIC	20	64.6 (43.6-85.6)		63.5 (42.4-84.6)	

IC: intervallo di confidenza; ^alog-rank test; ^bmediana.

Tabella 7. Analisi univariata e multivariata della sopravvivenza nucleare come fattore predittivo di recidiva entro i primi tre anni dalla diagnosi

Survivina nucleare	HR	IC 95%	P^a
Negativi	1		
Positivi	8.335	1.76, 39.40	0.007
Positivi ^b	6.261	1.19, 32.81	0.030
Positivi ^c	6.536	1.27, 33.54	0.024
Positivi ^d	7.320	1.43, 37.38	0.017

HR: Hazard ratio; IC: intervallo di confidenza; ^amodello dei rischi proporzionali di Cox; analisi stratificata per lo stadio^b, il livello di Clark^c e lo spessore^d.

Tabella 8. Espressione della sopravvivenza in relazione a quella della p53 e della p16

	N° pazienti	Survivina totale	P^a	Survivina nucleare	P^a	Survivina citoplasmatica	P^a
p53			0.012		0.001		0.205
Positivi	38	35		30		27	
Negativi	30	20		11		16	
p16 nucleare			1		1		1
Positivi	34	28		20		21	
Negativi	34	27		21		22	
p16 citoplasmatica			0.759		0.323		0.801
Positivi	40	33		22		26	
Negativi	28	22		19		17	

^aTest esatto di Fisher.

Tabella 9. Espressione della survivina, della p53 e della p16 in relazione alle variabili clinico-patologiche

	N° pazienti	Espressione “alterata” delle proteine											
		Survivina totale	<i>P</i> ^a	Survivina nucleare	<i>P</i> ^a	Survivina citoplasm.	<i>P</i> ^a	p53	<i>P</i> ^a	p16 nucleare	<i>P</i> ^a	p16 citoplasm.	<i>P</i> ^a
Totale	68	55		41		43		38		34		40	
Sesso			0.360		0.455		0.325		0.143		1		0.807
Maschi	30	26		20		21		20		15		17	
Femmine	38	29		21		22		18		19		23	
Età			1		0.310		0.451		0.131		0.803		0.313
≥ 67 ^b	26	21		18		18		18		12		13	
< 67	42	34		23		25		20		22		27	
Spessore			0.030		0.001		0.801		0.027		0.460		0.466
T1, T2	28	19		10		17		11		16		18	
T3, T4	40	36		31		26		27		18		22	
Livello di Clark			0.066		0.001		1		0.027		0.454		0.453
II, III	26	18		9		16		10		15		17	
IV, V	42	37		32		27		28		19		23	
Stadio			0.026		<0.0001		0.615		0.050		0.621		0.622
IA, IB	27	18		9		16		11		15		17	
IIA, IIB, IIC	41	37		32		27		27		19		23	
Localiz. anatomica			0.023		0.028		0.074		0.482		0.429		0.256
Testa e collo	14	7		5		5		7		6		6	
Tronco	16	14		8		10		7		10		10	
Arti sup.	11	10		10		7		8		7		9	
Arti inf.	27	24		18		21		16		11		15	

^aTest esatto di Fisher; ^bmediana.

Tabella 10. Espressione dell'8-OHdG in relazione a quella della p53 e della survivina

	8-OHdG nucleare		P^a
	N° pazienti		
	Negativi	Positivi	
p53			0.021
Negativi	5	9	
Positivi	3	37	
Survivina nucleare			0.002
Negativi	5	4	
Positivi	3	42	
Survivina citoplasmatica			> 0.05
Negativi	4	10	
Positivi	4	36	
Survivina totale			0.036
Negativi	3	3	
Positivi	5	43	

^aTest esatto di Fisher.

Tabella 11. Espressione dell'8-OHdG in relazione a quella dell'OGG1 e della G6PD

	8-OHdG nucleare		P^a
	N° pazienti		
	Negativi	Positivi	
OGG1 nucleare			> 0.05
Negativi	4	26	
Positivi	4	17	
OGG1 citoplasmatica			> 0.05
Negativi	3	13	
Positivi	5	30	
G6PD			> 0.05
Negativi	6	20	
Positivi	2	25	

^aTest esatto di Fisher.

ICONOGRAFIA



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

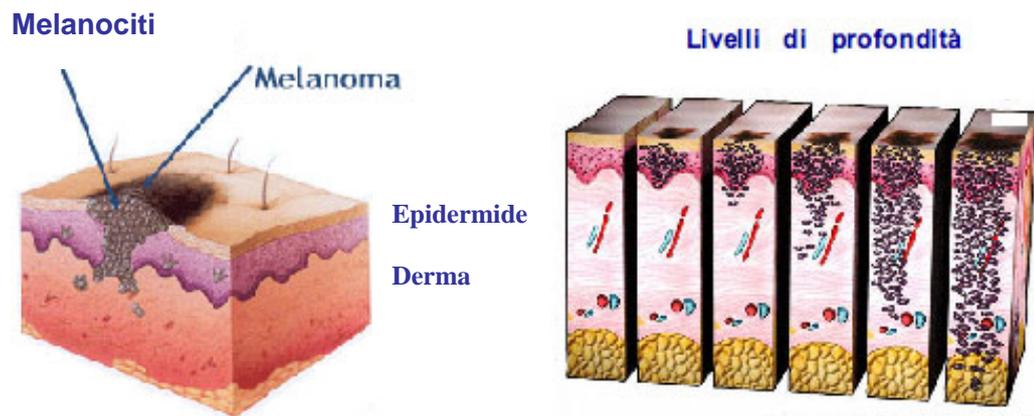


Fig. 2. Il melanoma, a seconda dell'istotipo, può presentare una fase iniziale con diffusione “piana” sulla superficie cutanea, che rappresenta la fase di crescita orizzontale (melanoma piano). Dopo un periodo di tempo variabile, il tumore può sviluppare una componente nodulare invasiva (melanoma piano-cupoliforme). 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
IIB	T3a	N0	M0
	T3b	N0	M0
IIC	T4a	N0	M0
	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
IIIC	T1-4b	N1b	M0
	T1-4b	N2b	M0
IV	Any T	N3	M0
	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).

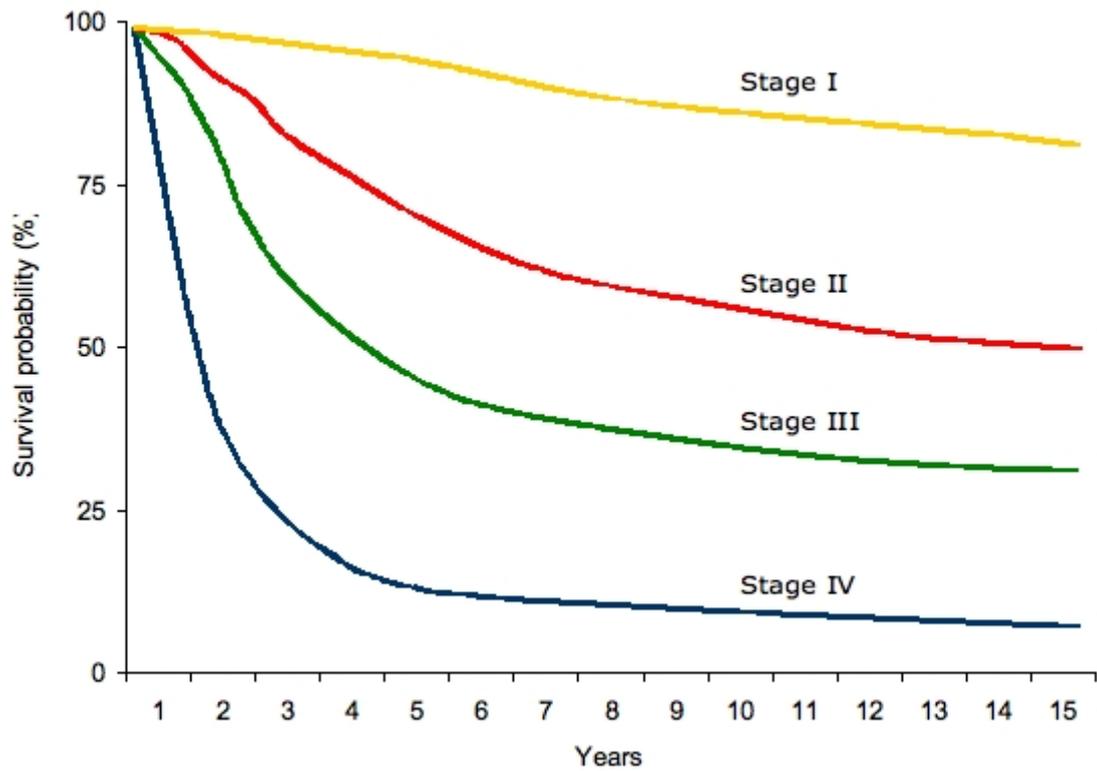


Fig. 4. Analisi del tempo di sopravvivenza di pazienti con melanomi di Stadio I e II, con metastasi regionali (Stadio III) e metastasi a distanza (Stadio IV). Le differenze tra le curve di sopravvivenza erano altamente significative ($P < 0.0001$).

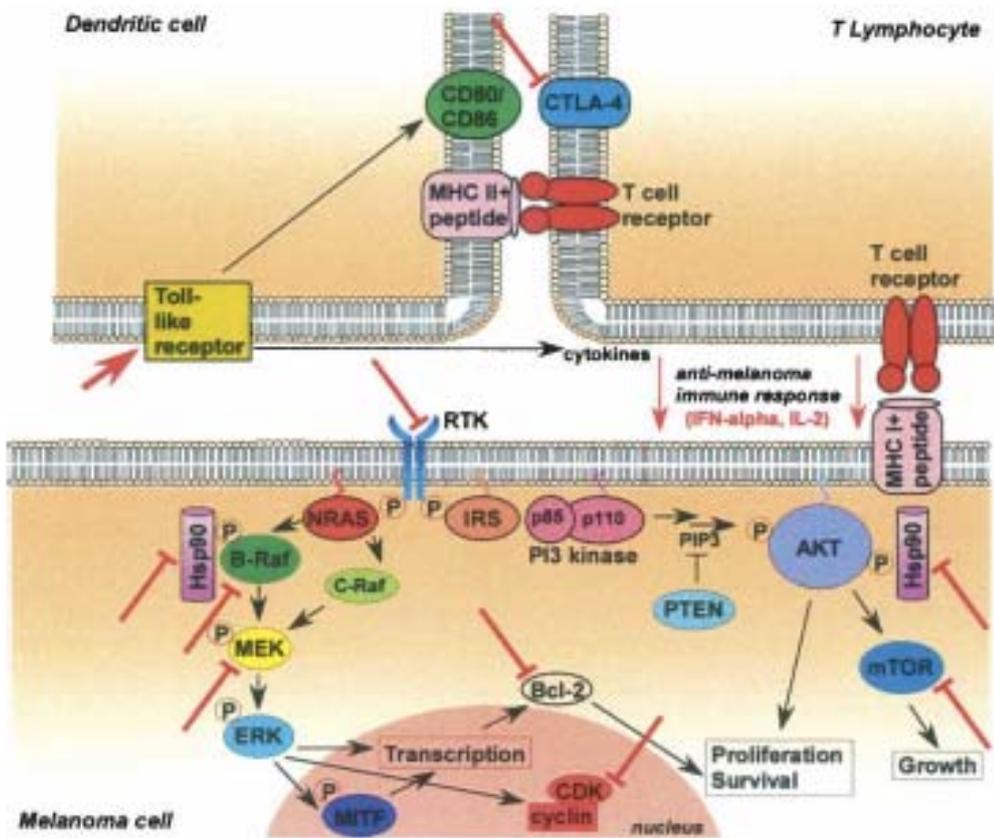


Fig. 5. La presenza di infiammazione e regressione nei melanomi primari è stata considerata un forte indicatore dell'esistenza di una risposta immunitaria antitumorale. Il melanoma cutaneo di stadio I e II è quasi sempre associato ad un infiltrato infiammatorio cronico, costituito principalmente da linfociti.

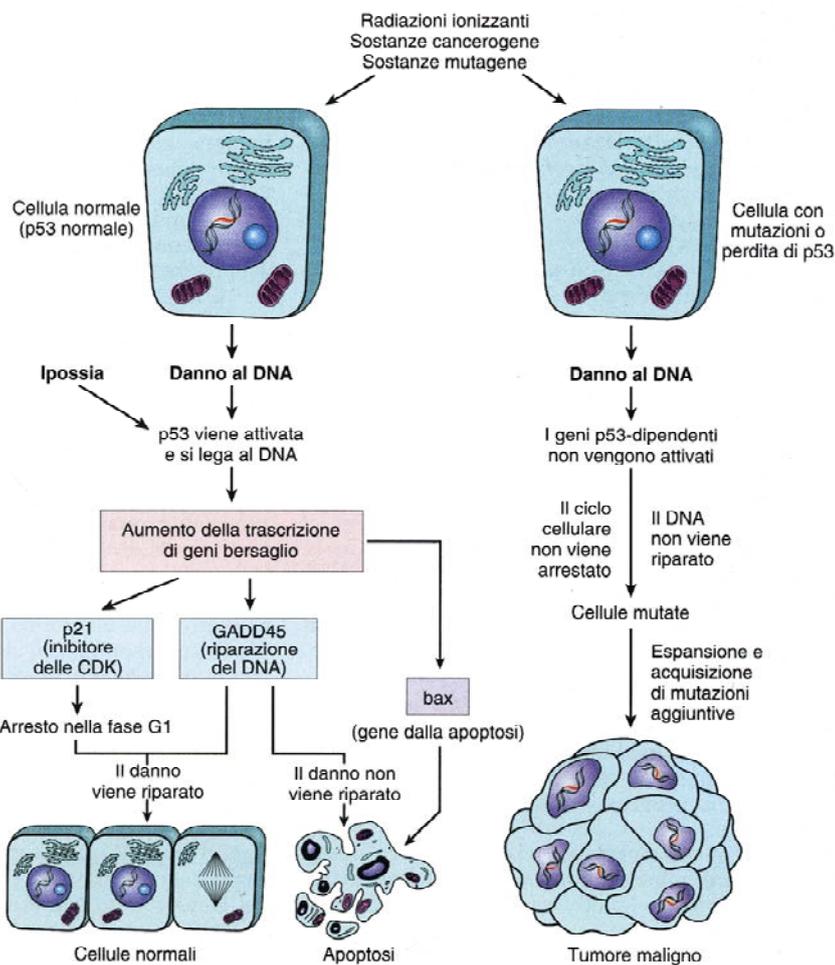


Fig. 6. Ruolo della p53 nel mantenimento dell'integrità del genoma. L'attivazione della p53 da parte di un insulto ipossico o di agenti che producono un danno al DNA porta all'arresto della cellula nella fase G1 ed al tentativo di riparare il danno mediante attivazione dei geni *p21* e *GADD45*. Se il danno viene riparato con successo, la cellula può riprendere il ciclo cellulare; se invece il tentativo fallisce, l'attivazione del gene *bax*, promossa dalla p53, porta la cellula all'apoptosi. Nelle cellule in cui il gene *p53* è perso o mutato, un danno al DNA non induce l'arresto del ciclo cellulare, l'attivazione dei meccanismi preposti alla riparazione del danno stesso, né l'apoptosi e pertanto tali cellule continuano a proliferare, fino a generare una neoplasia maligna.

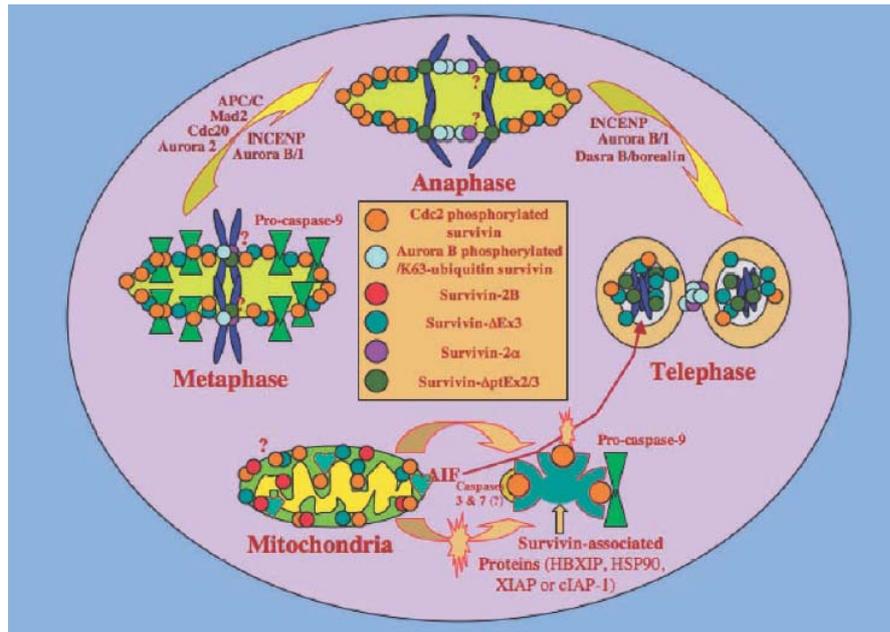


Fig. 7. La survivina è coinvolta nella mitosi, nell'apoptosi, nella risposta allo stress cellulare e in meccanismi chiave per l'integrità genomica. L'espressione di questa proteina si riscontra soprattutto durante la fase G2/M del ciclo cellulare. Essa svolge un ruolo importante nel controllo della divisione cellulare attraverso l'associazione con la chinasi Aurora B, la proteina INCENP e la proteina Borealin/Dasra B nel "chromosomal passenger complex". La survivina è inoltre coinvolta nella formazione del fuso mitotico e nella progressione del ciclo cellulare delle cellule tumorali. Questa proteina è anche localizzata nei mitocondri.

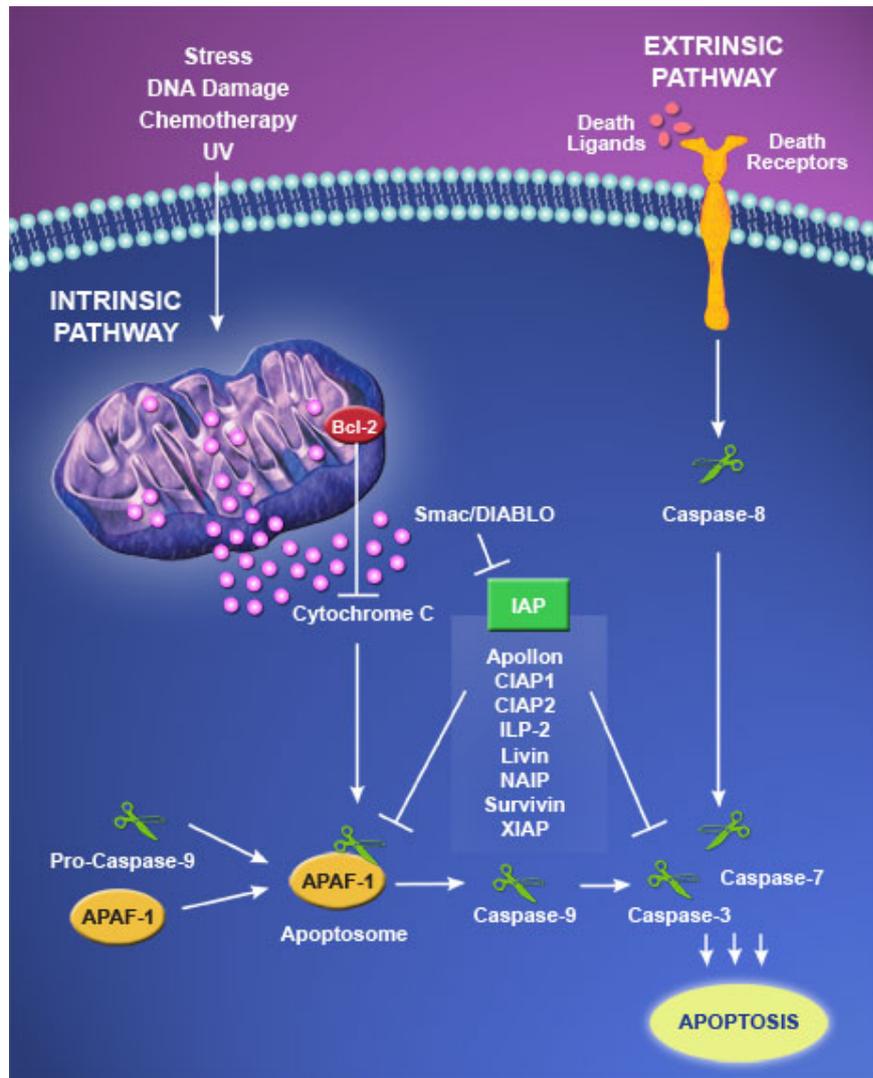


Fig. 8. Il meccanismo con cui la survivina inibisce l'apoptosi, innescata dalla via estrinseca o intrinseca, sembra sia legato alla sua capacità di inibire direttamente o indirettamente le caspasi.

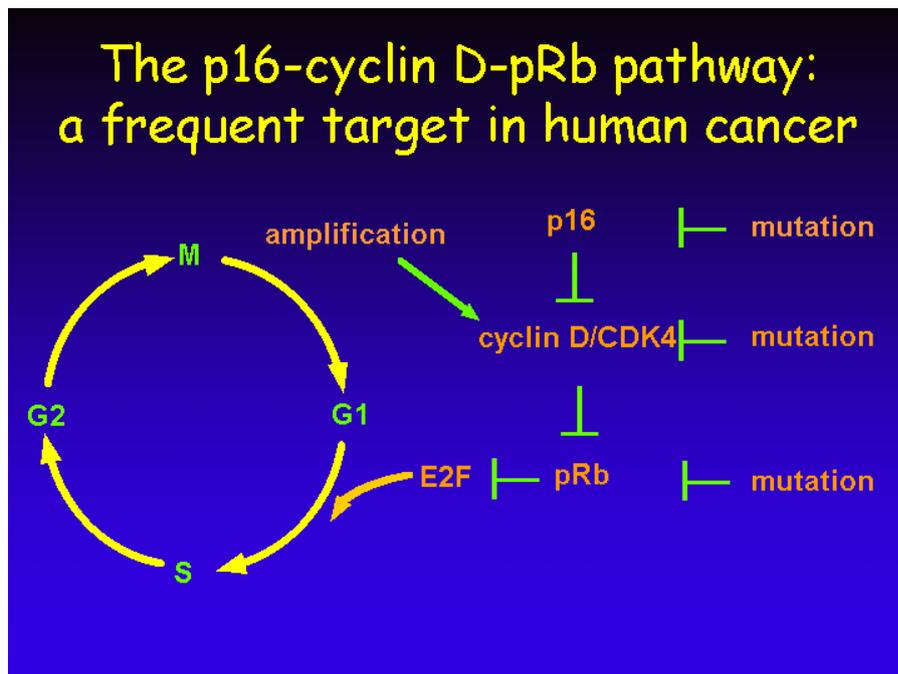


Fig. 9. La proteina p16 blocca la progressione del ciclo cellulare alla fase S inibendo le chinasi ciclina-dipendenti Cdk4 e Cdk6. Il gene della p16 risulta frequentemente mutato o deletato in molti tumori, compreso il melanoma.

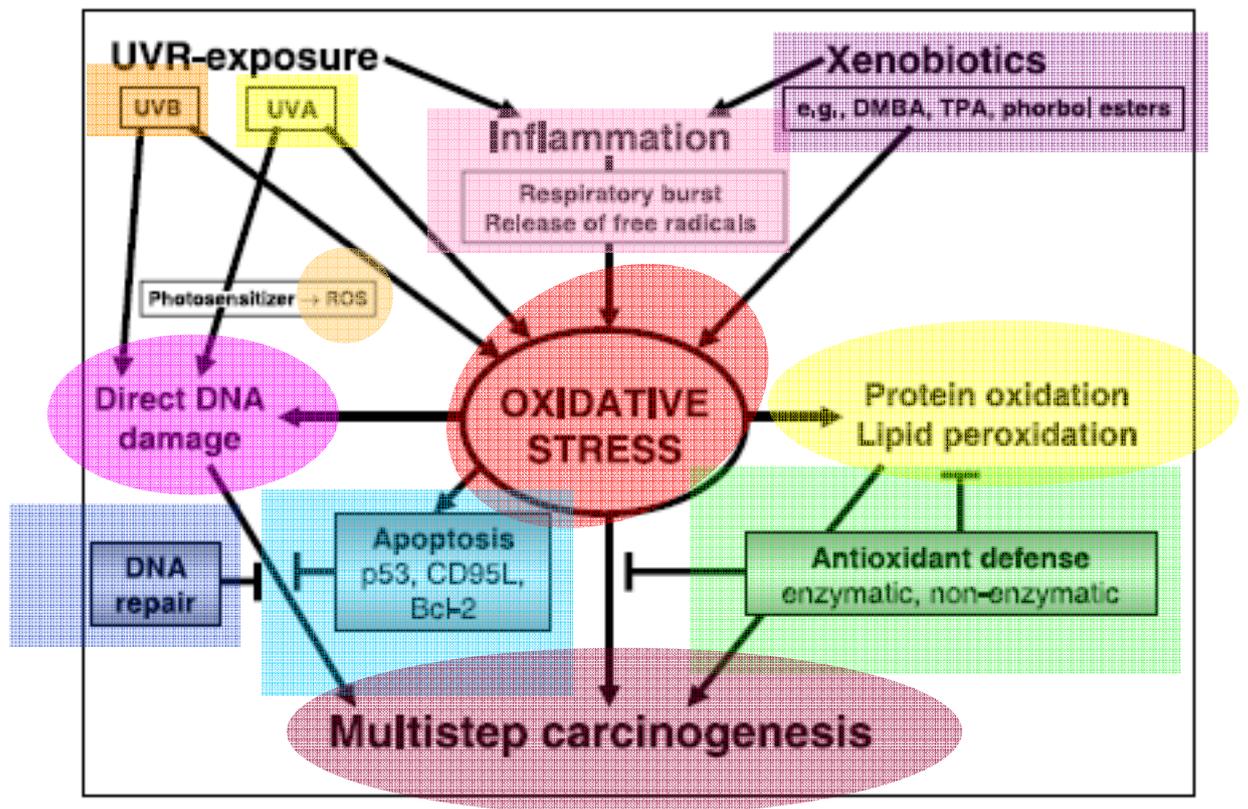


Fig. 10. Nella patogenesi di numerosi tumori, compreso il melanoma cutaneo, è stato implicato lo stress ossidativo indotto dalle radiazioni UV. Lo stress ossidativo può danneggiare numerose strutture cellulari e bio-macromolecole, compresi gli acidi nucleici.

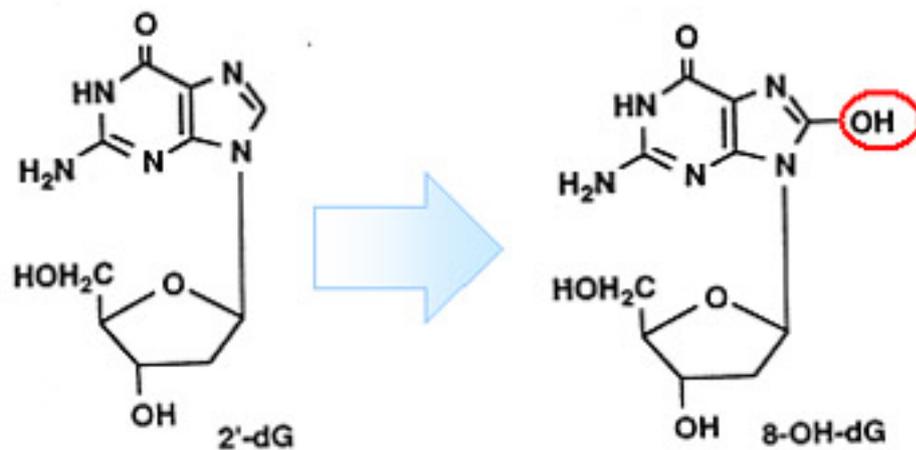


Fig. 11. Uno tra i danni ossidativi più frequenti è la formazione della 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG), una base modificata generata dall'ossidazione della deossiguanosina in posizione 8.

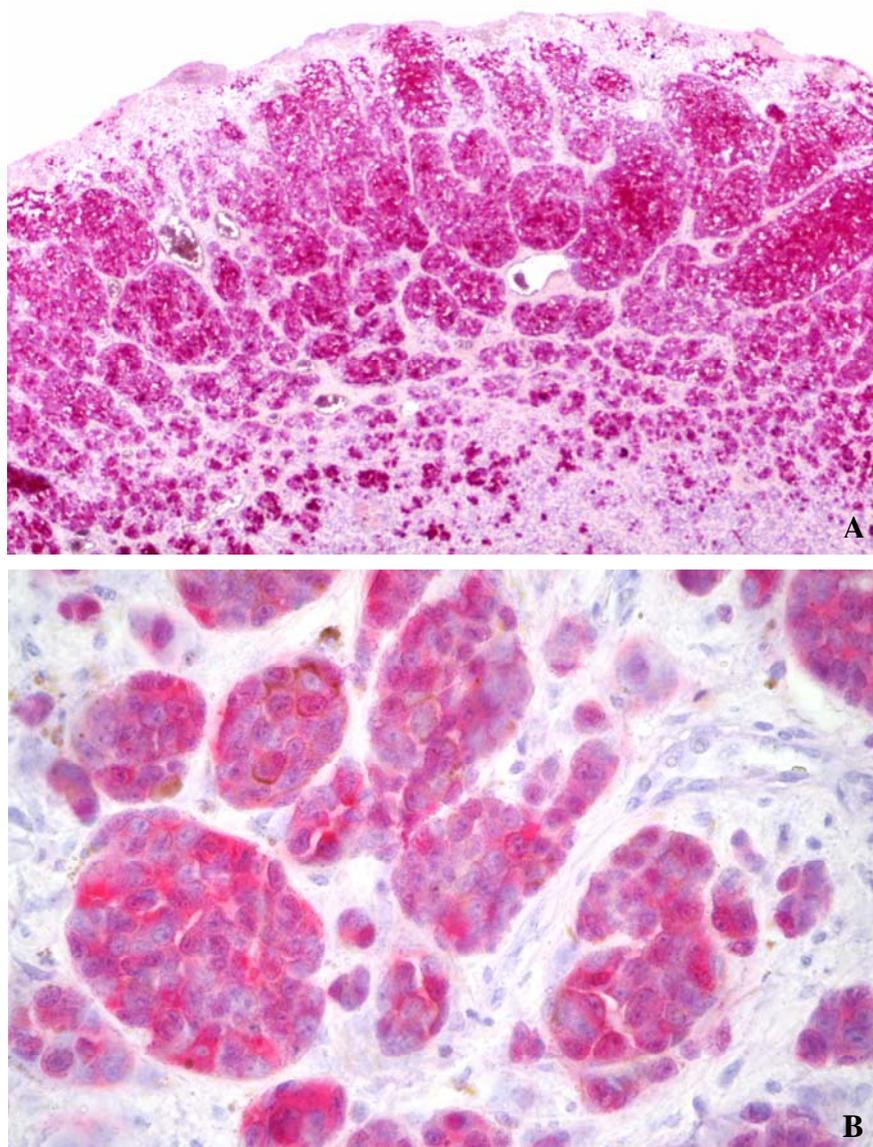


Fig. 12. Anti-HMB45 umano. Immunoreattività per l'antigene HMB45, marcatore specifico per i melanociti attivati. A: 40X; B: 400X.

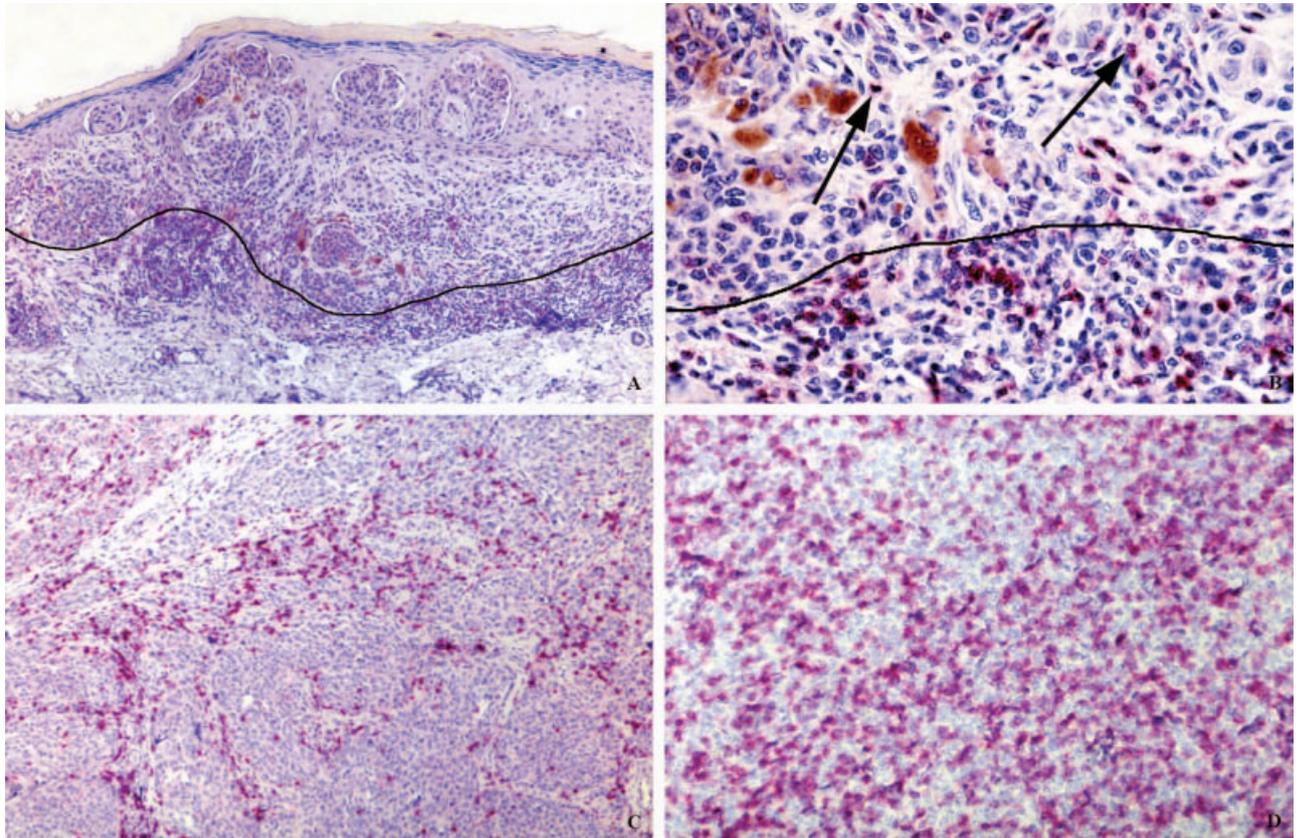


Fig. 13. Anti-CD8 umano. I linfociti T (CD8) infiltranti il tumore sono stati contati in campi microscopici adiacenti, al di sopra di una linea immaginaria che definiva il fronte di avanzamento del tumore (A). L'immagine B mostra un dettaglio della A; le frecce indicano i linfociti positivi in adiacenza alle cellule tumorali. In molti casi, in prossimità di questi linfociti, si trovavano cellule pigmentate con morfologia macrofagica (B). Le cellule CD8+ infiltravano lo stroma perinodulare all'interno della massa tumorale (C). In alcuni casi, i linfociti CD8 erano diffusi nell'area tumorale in stretta vicinanza alle cellule tumorali (D). A, C: 100X; B: 400X; D: 200X.

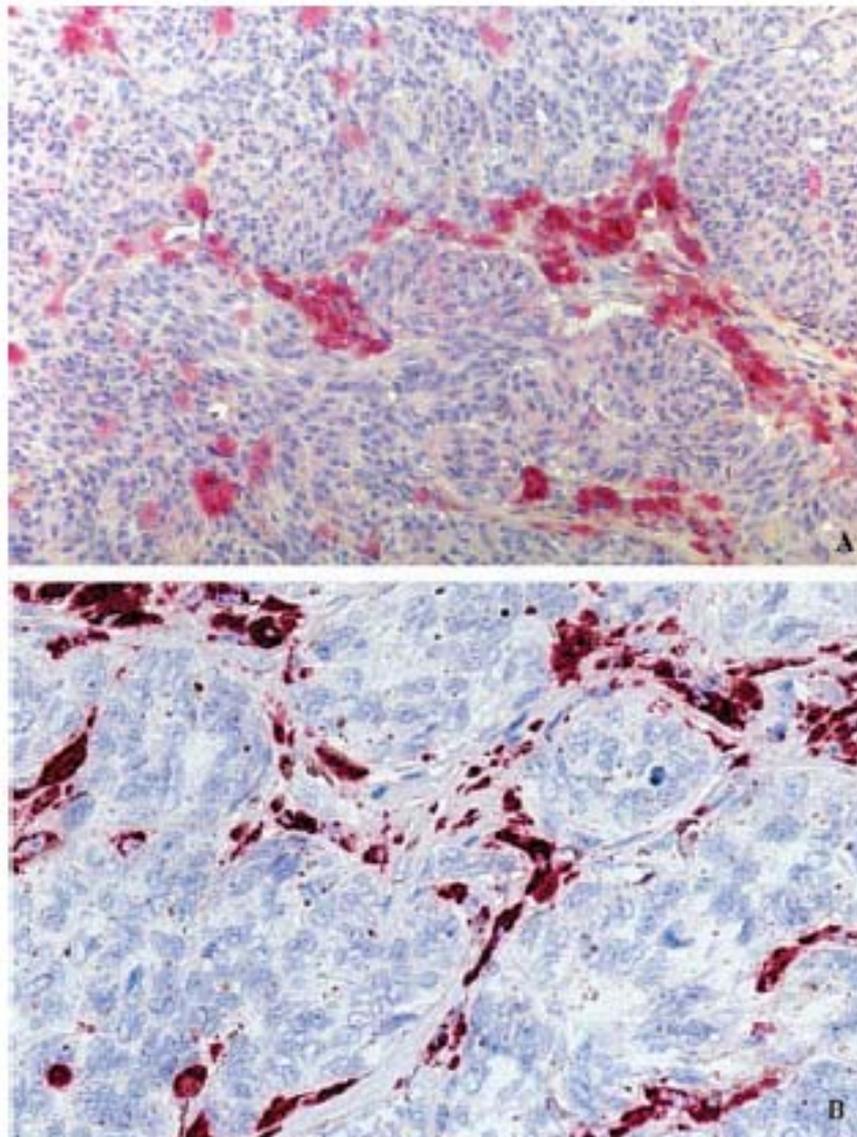


Fig. 14. Anti-CD4 umano e anti-CD68 umano. Le cellule CD4+ erano localizzate prevalentemente nello stroma intorno ai noduli tumorali (A). Le cellule CD68+ colocalizzavano con quelle con morfologia macrofagica CD4+ (B). A: 200X; B: 400X.

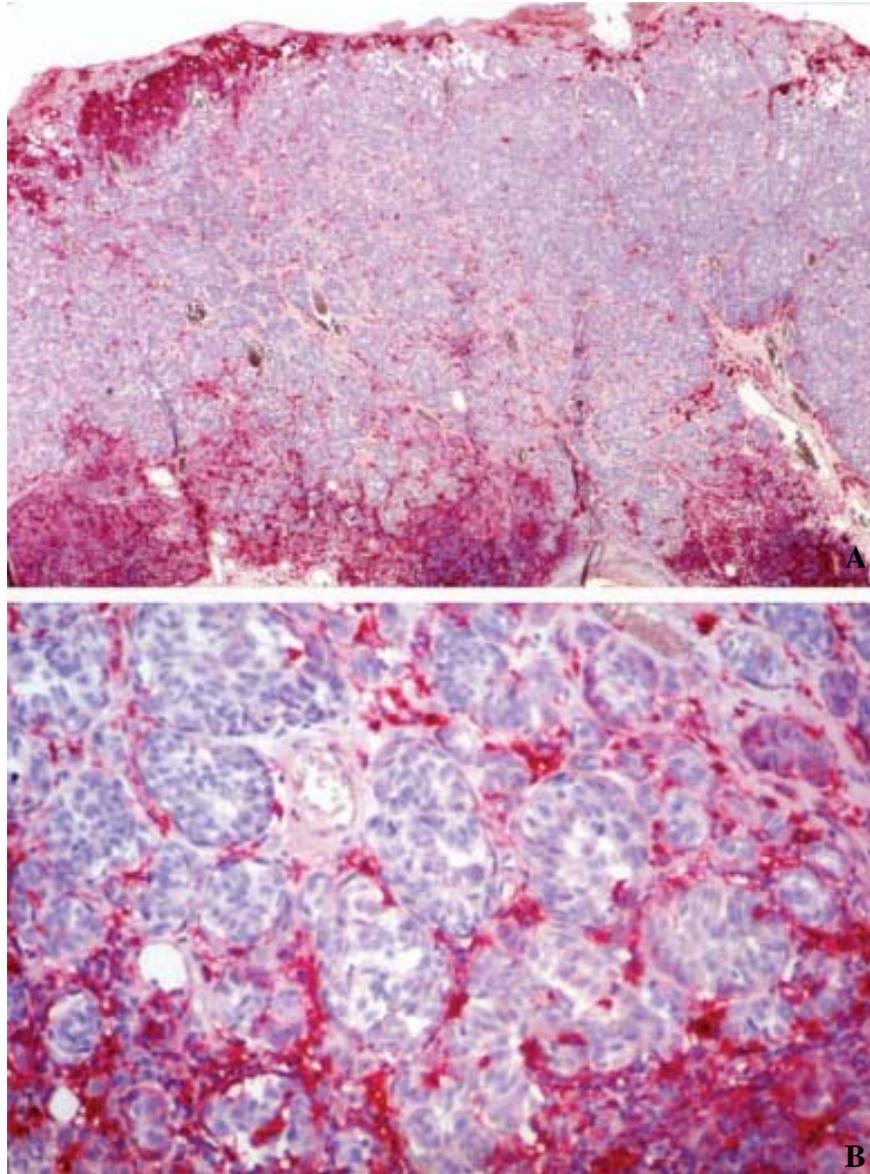


Fig. 15. Anti-HLA-DR umano. Le cellule positive per l'antigene HLA-DR erano numerose nella periferia del tumore adiacente al derma e gradualmente si distribuivano in tutta la massa tumorale (A), nei noduli tumorali e nello stroma intorno ad essi (B). A: 40X; B: 200X.

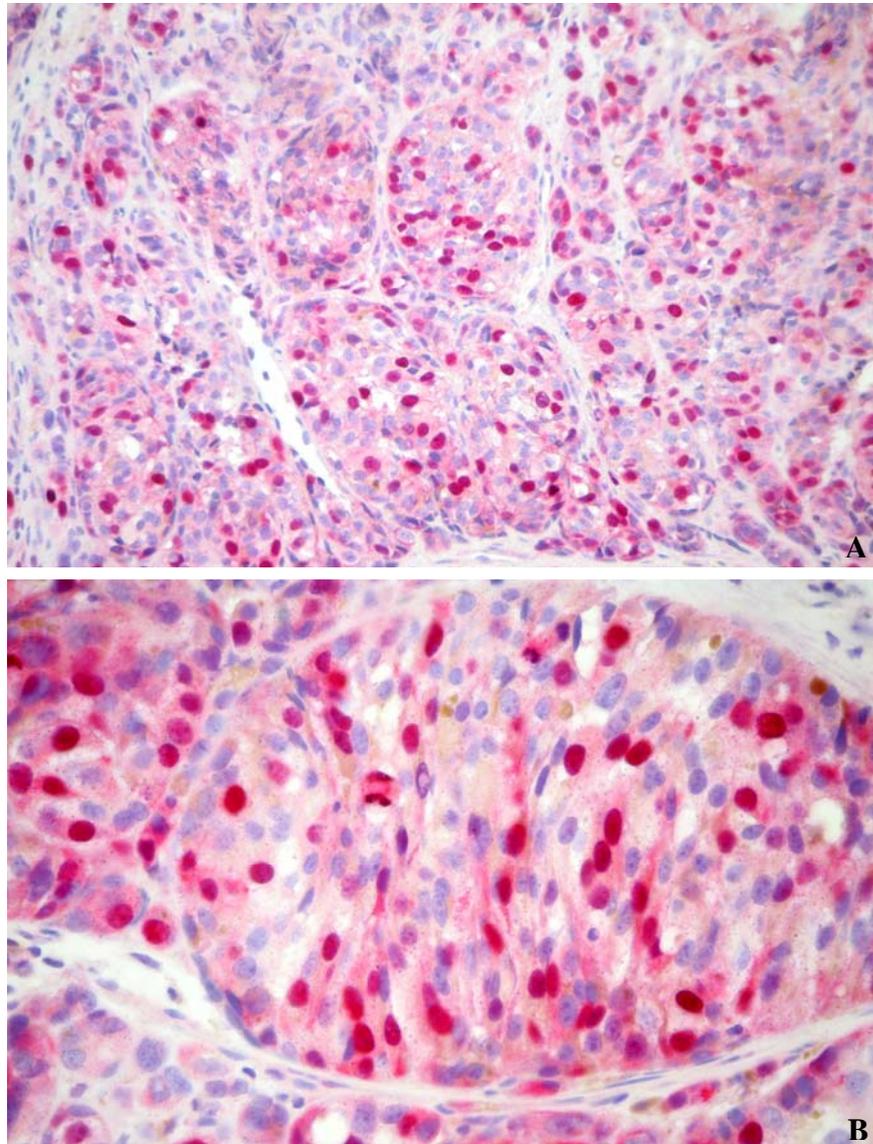


Fig. 16. Anti-survivina umana. L'immunoreattività per la survivina era presente sia nel nucleo che nel citoplasma delle cellule tumorali (survivina totale; A, B). A: 200X; B: 630X.

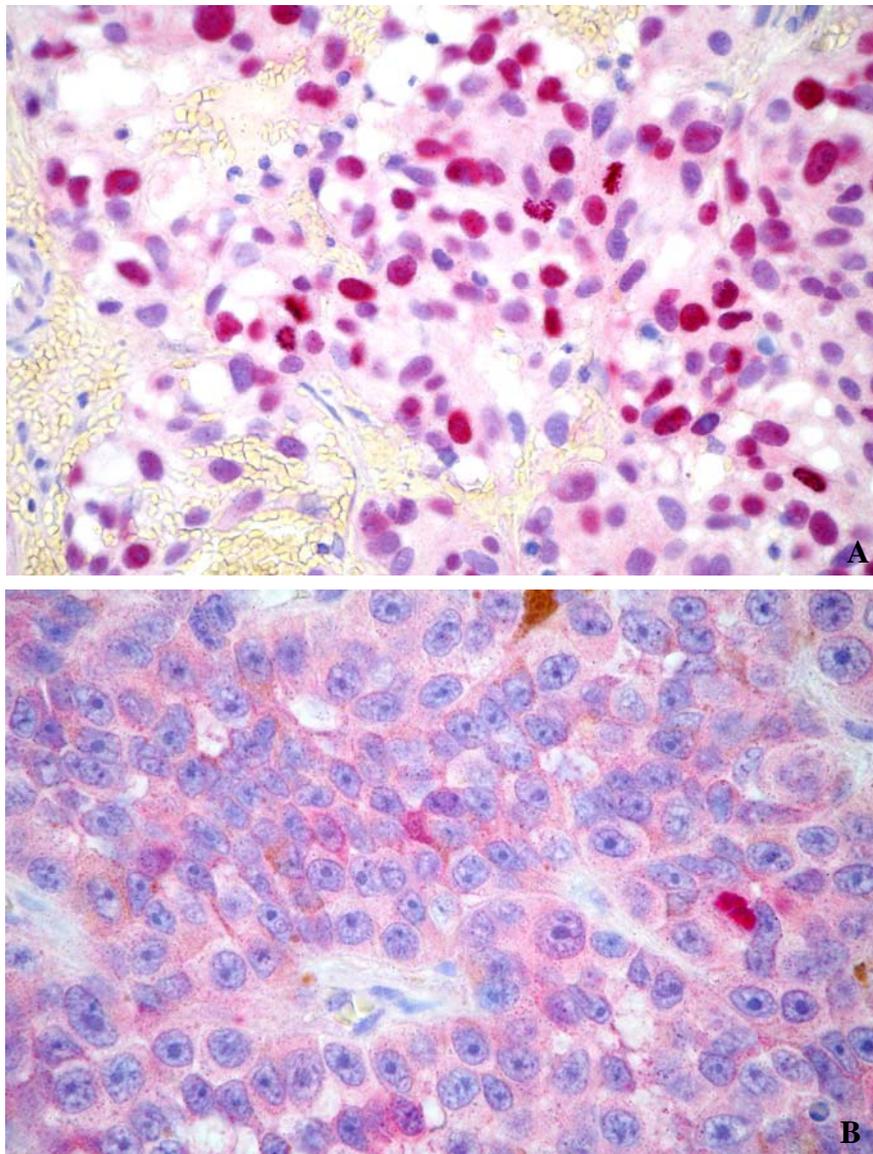


Fig. 17. Anti-survivina umana. L'espressione della survivina, in alcuni casi, era prevalente nel nucleo delle cellule tumorali, con una immunoreattività citoplasmatica molto debole (A); in altri casi, la survivina era presente esclusivamente nel citoplasma (B). A, B: 400X.

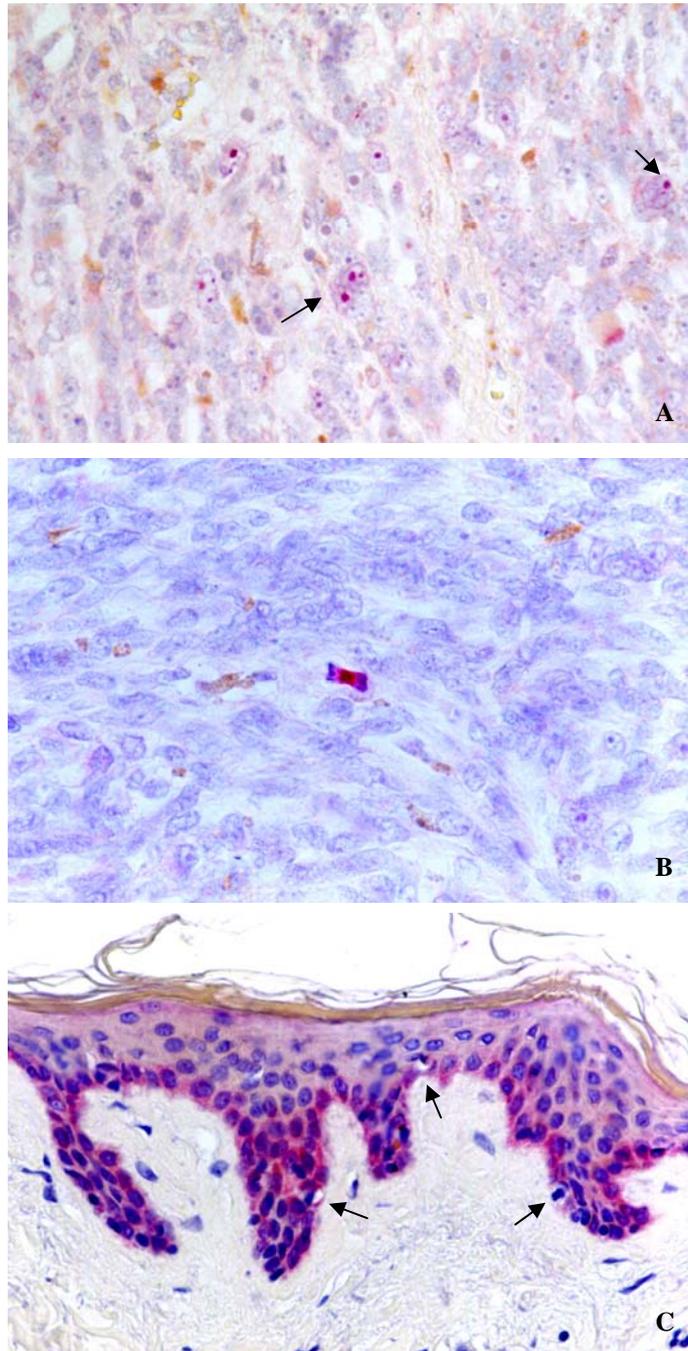


Fig. 18. Anti-survivina umana. I nucleoli (freccie; A) e le figure mitotiche, con la survivina localizzata nel fuso mitotico (B), risultavano spesso marcatamente colorati. I cheratinociti degli strati basali dell'epidermide, adiacente al tumore, mostravano immunoreattività per la survivina in prevalenza citoplasmatica, mentre i melanociti istologicamente normali erano negativi (freccie; C). A, B: 630X; C: 200X.

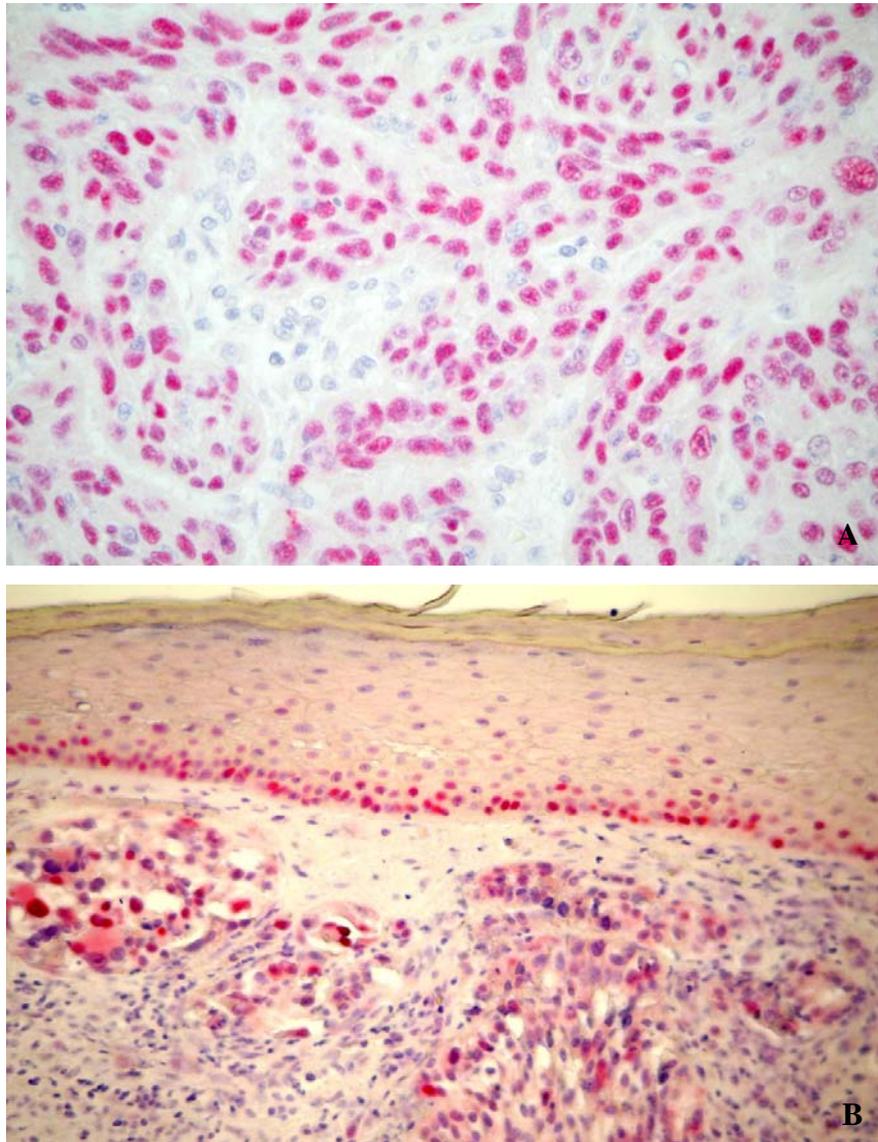


Fig. 19. Anti-p53 umana. L'immunoreattività per la p53 era esclusivamente nucleare (A); le cellule positive erano presenti in tutto il tumore e negli strati basali dell'epidermide (B). A: 400X; B: 200X.

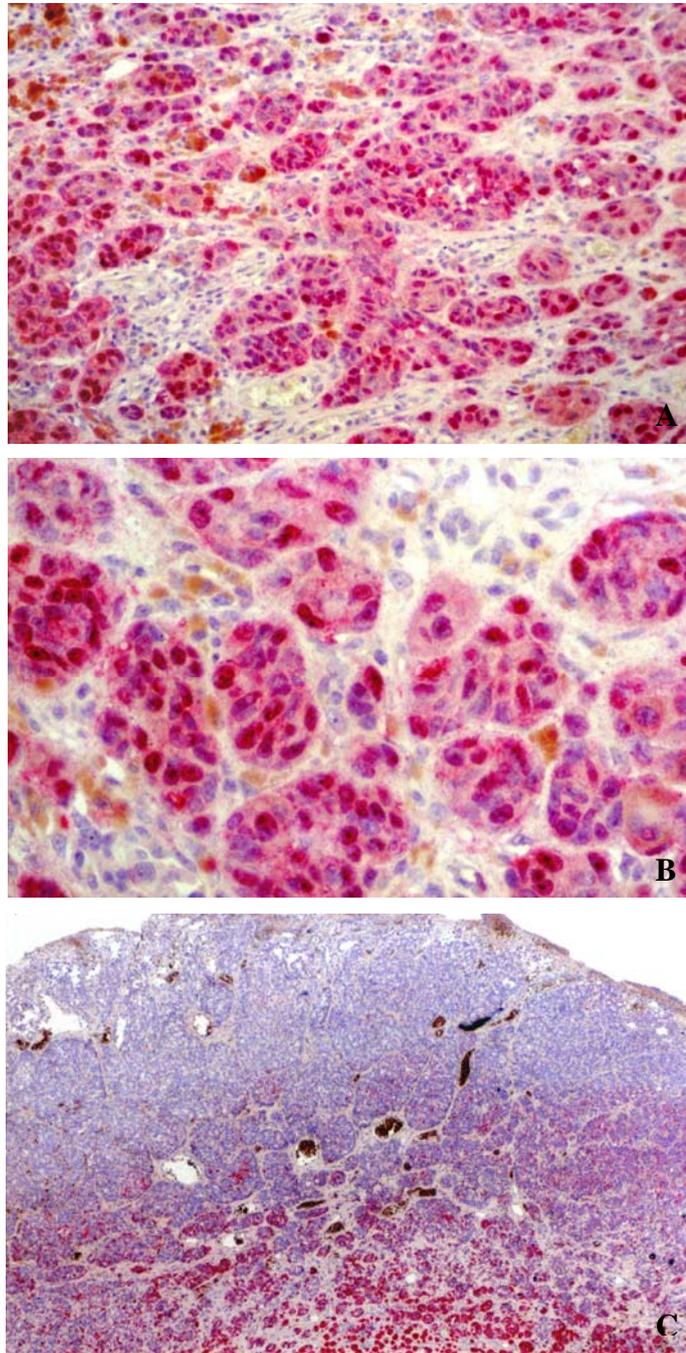


Fig. 20. Anti-p16 umana. L'immunoreattività per la p16 era presente sia nel nucleo che nel citoplasma delle cellule tumorali (A, B). In molti tumori, l'espressione della p16 era più marcata nel fronte di avanzamento del tumore (C). A: 200X; B: 400X; C: 40X.

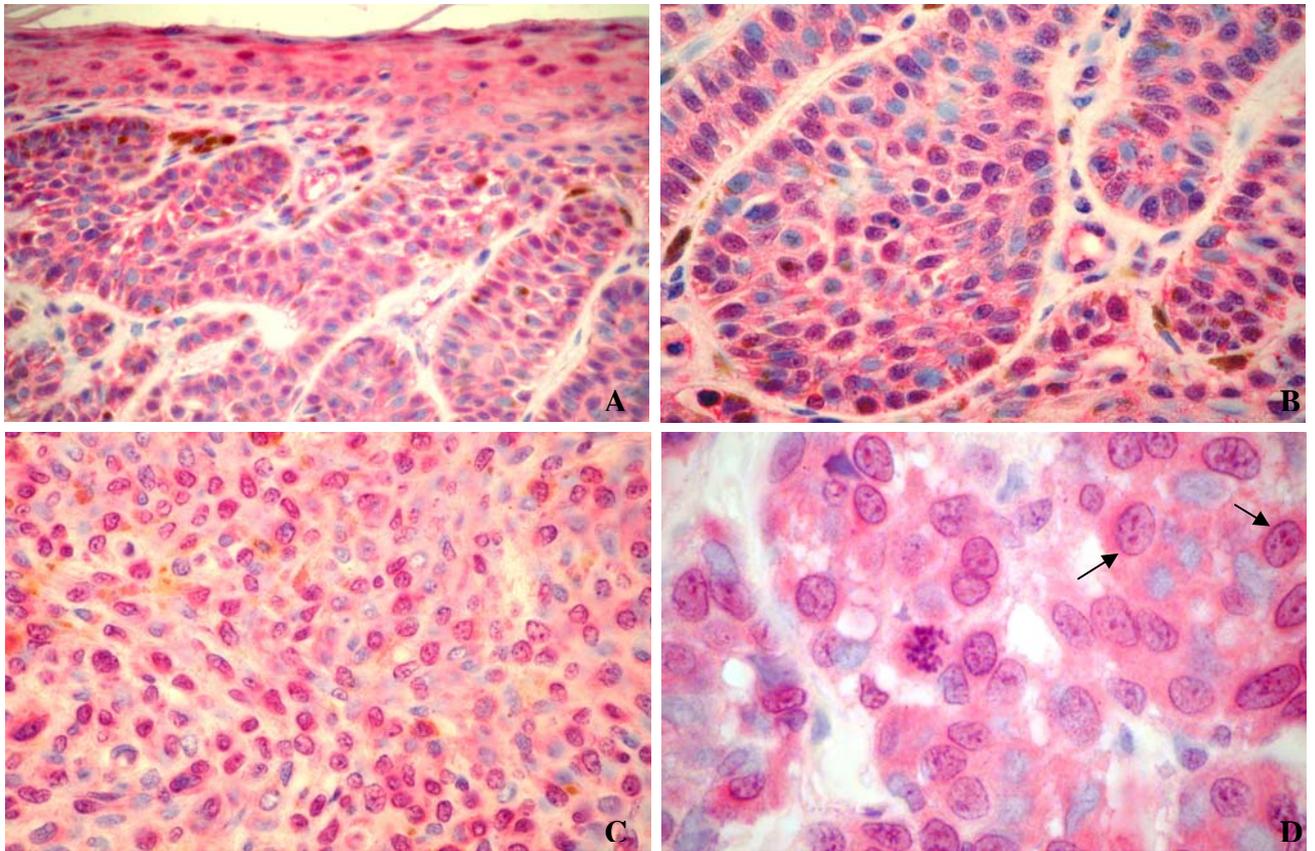


Fig.21. Anti-8-OHdG umana. L'immunoreattività per l'8-OHdG era presente sia nel nucleo che nel citoplasma delle cellule tumorali (A-D). La colorazione presentava un aspetto granulare (B, C) e spesso i nucleoli (freccie) erano fortemente positivi (D). A: 400X, B, C: 630X, D: 1000X.

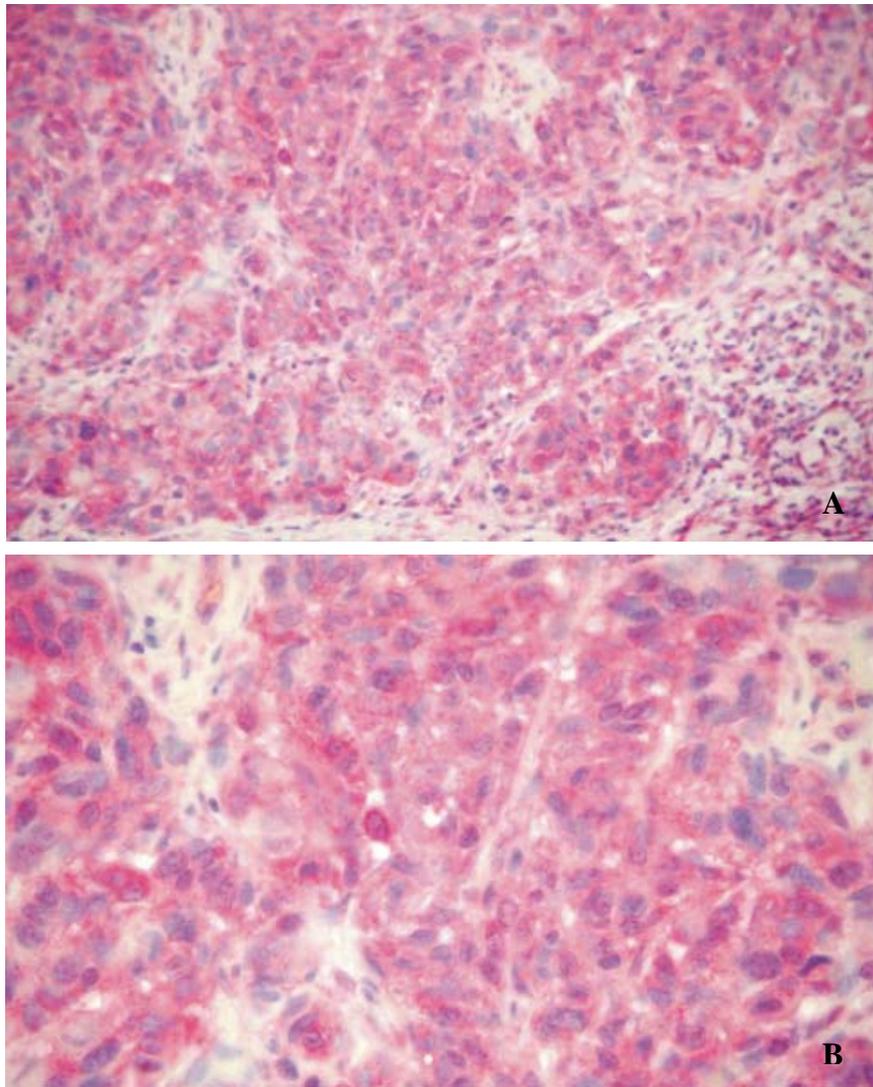


Fig.22. Anti-OGG1 umana. Le cellule tumorali positive per l'OGG1 erano distribuite in tutto il tumore e mostravano un'intensa colorazione omogenea o granulare sia nel nucleo che nel citoplasma (A, B). A: 200X, B: 400X.

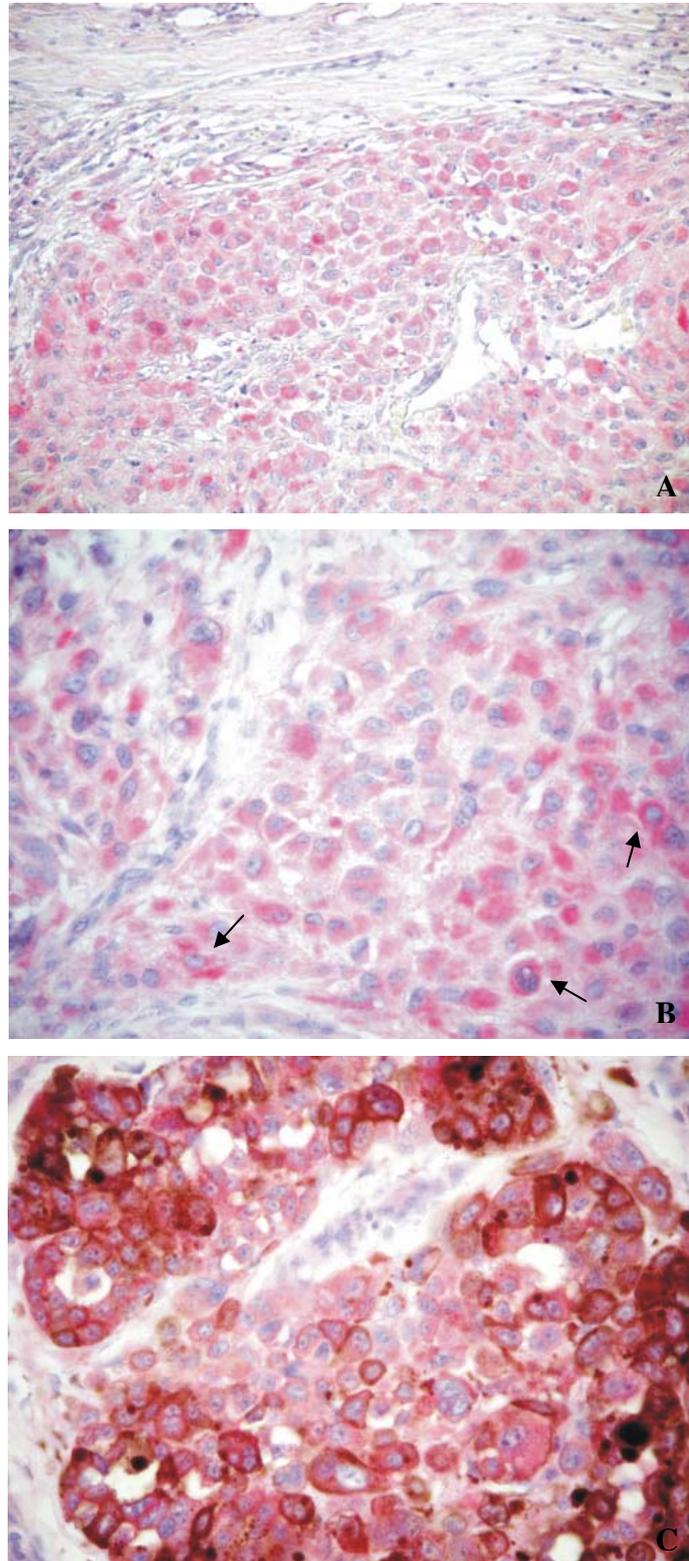


Fig.23. Anti-G6PD umana. La positività per la G6PD era presente esclusivamente a livello citoplasmatico. Le cellule positive erano distribuite in tutto il tumore (A) e, mentre in alcuni casi mostravano un'intensità di colorazione omogenea, in altri alcune cellule (freccie) mostravano una colorazione più forte rispetto alle altre (B, C). A: 200X, B, C: 400X.

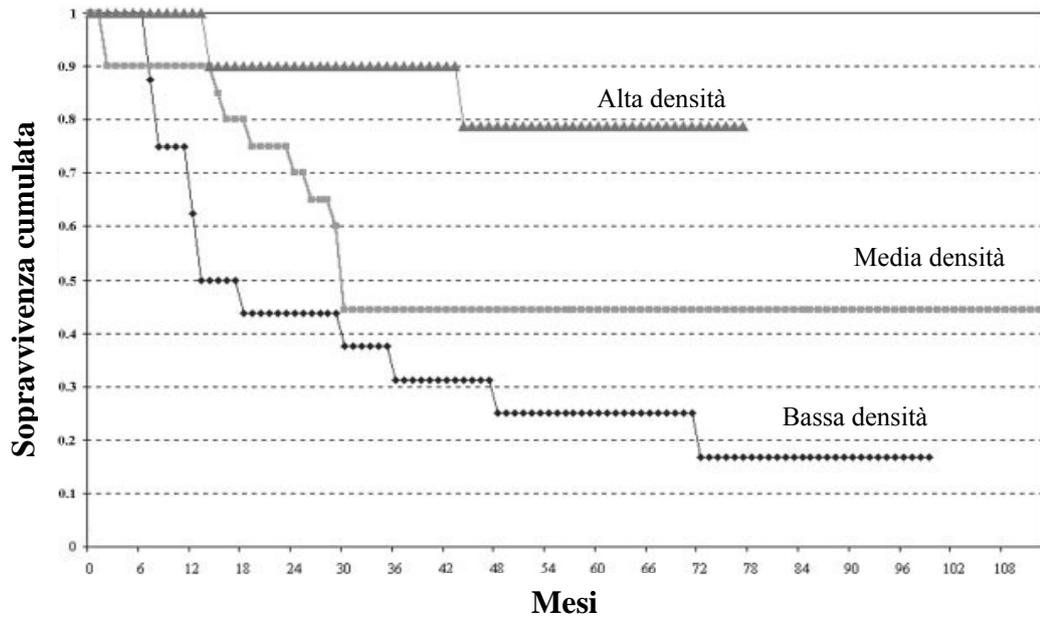


Fig. 24. Analisi del tempo di sopravvivenza, condotta con il metodo di Kaplan-Meier, nei gruppi di pazienti con diversa densità di linfociti T (CD8) infiltranti. La presenza dei linfociti CD8 infiltranti la base del tumore mostrava una correlazione positiva, statisticamente significativa, con la sopravvivenza.

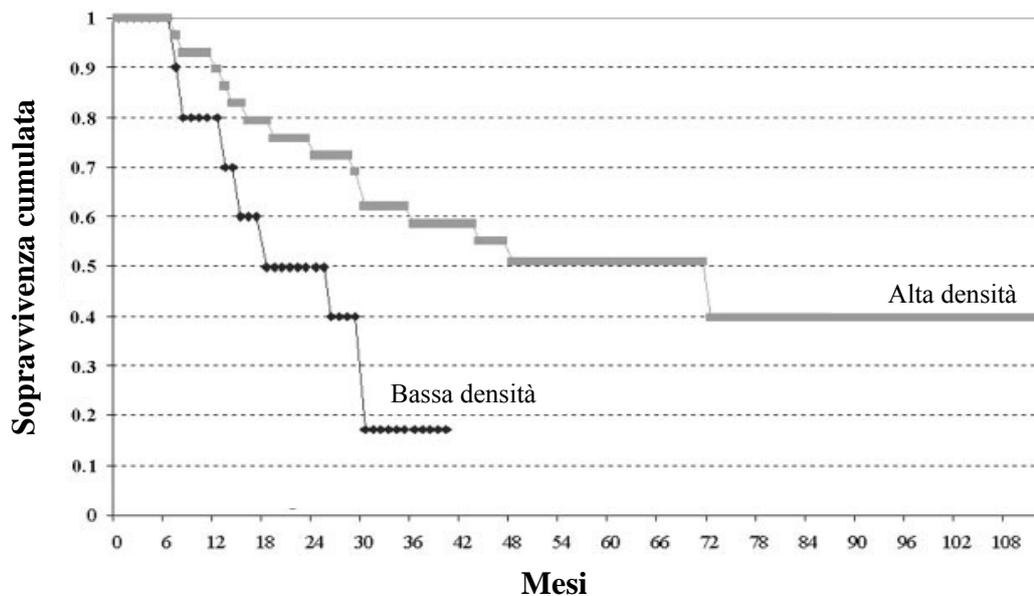


Fig. 25. Analisi del tempo di sopravvivenza, condotta con il metodo di Kaplan-Meier, nei gruppi di pazienti con diversa densità di cellule HLA-DR. La presenza delle cellule HLA-DR infiltranti la base del tumore era correlata significativamente con una migliore prognosi.

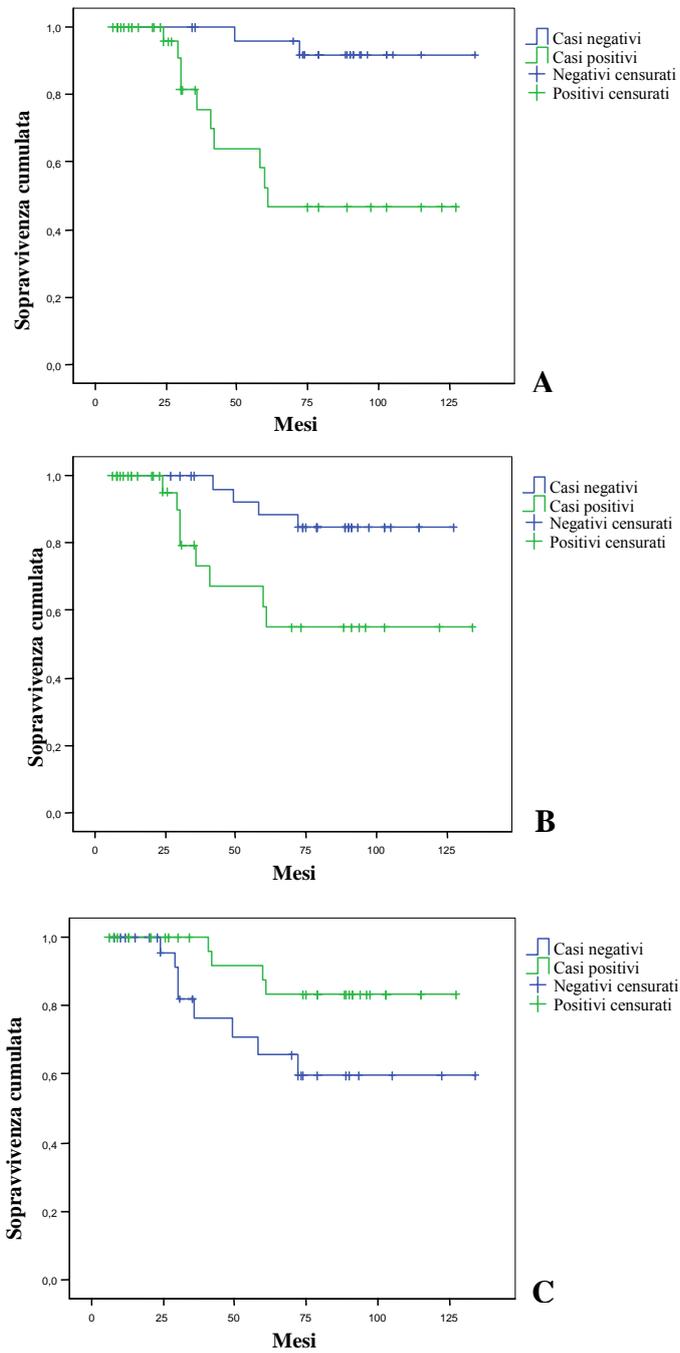


Fig. 26. Analisi del tempo di sopravvivenza, condotta con il metodo di Kaplan-Meier, nei gruppi di pazienti con tumori positivi o negativi per la survivina nucleare (A), la p53 (B) e la p16 nucleare (C). L'overespressione della survivina nucleare o della p53 e l'assenza della p16 nucleare erano associate a un'aumentata mortalità per melanoma.

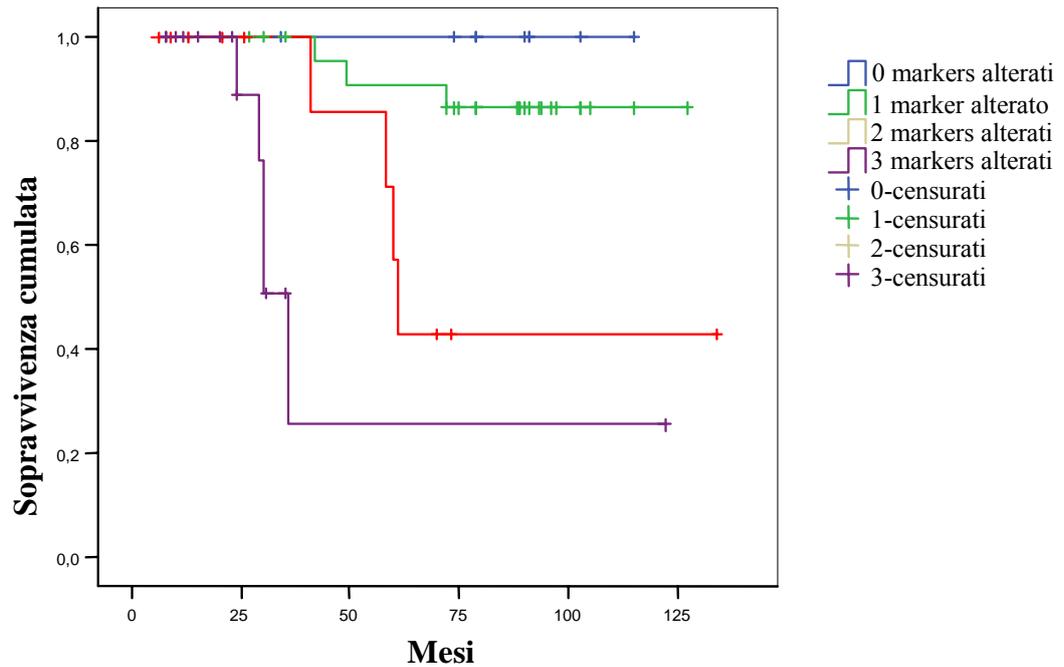


Fig. 27. Analisi del tempo di sopravvivenza, condotta con il metodo di Kaplan-Meier, nei gruppi di pazienti con un diverso numero di markers (survivina nucleare, p53, p16 nucleare) “alterati”. Il rischio di mortalità per melanoma aumentava progressivamente con l’aumentare del numero dei markers alterati.

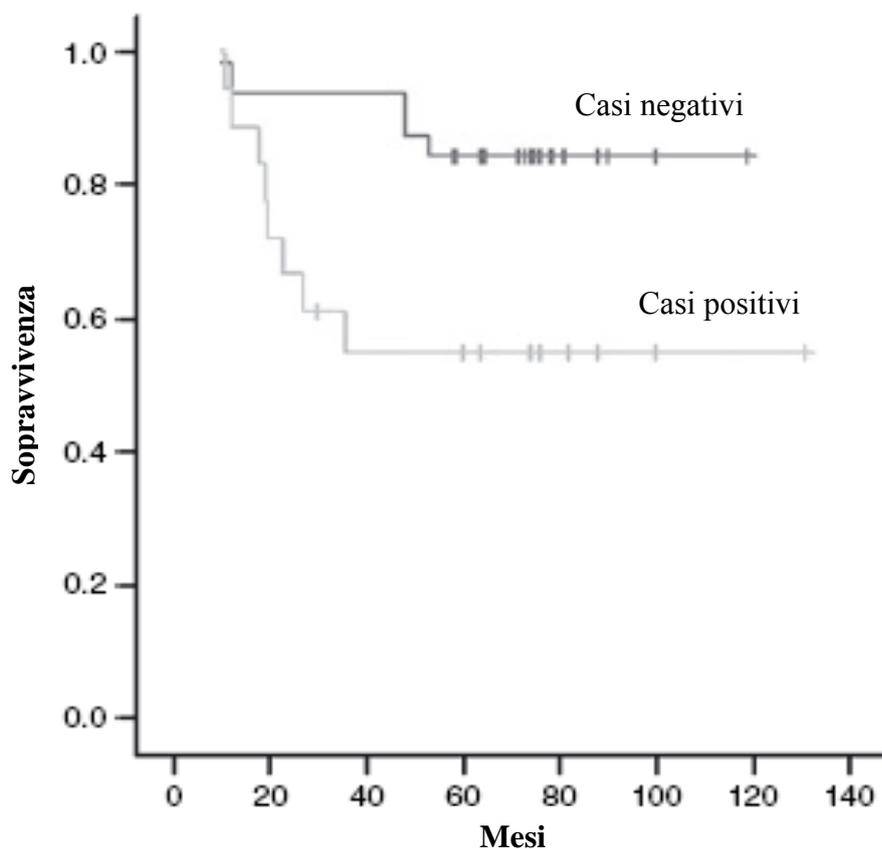


Fig.28. Analisi del tempo di sopravvivenza libero da recidiva, condotta con il metodo di Kaplan-Meier, nei gruppi di pazienti con tumori positivi o negativi per la sopravvivenza nucleare. I pazienti che presentavano immunoreattività per la sopravvivenza nucleare nelle cellule tumorali avevano un tempo di sopravvivenza libero da recidiva ridotto rispetto ai pazienti senza l'espressione della sopravvivenza nucleare.