

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA

ȘCOALA DOCTORALĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

**STUDIUL PARAMETRILOR CLINICO-MORFOLOGICI ȘI AL
MARKERILOR IMUNOHISTOCHIMICI CU IMPLICAȚII
TUMORIGENICE, PROGNOSTICE ȘI TERAPEUTICE ÎN
MELANOMUL MALIGN CUTANAT**

REZUMAT

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

PROF. UNIV. DR. ANICA DRICU

STUDENT-DOCTORAND:

BLENDEA ANTONIA

CRAIOVA

2017

CUPRINS

Introducere

STADIUL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I: ELEMENTE DE EMBRIOLOGIE ȘI HISTOLOGIE CUTANATĂ

I.1. INTRODUCERE

I.2. EMBRIOGENEZA CUTANATĂ

I.3. HISTOLOGIA CUTANATĂ

I.4. VASCULARIZAȚIA ȘI INERVAȚIA CUTANATĂ

CAPITOLUL II: CARCINOGENEZA CUTANATĂ ȘI FACTORII DE RISC

II.1. INTRODUCERE

II.2. DEFINIȚIA CARCINOGENEZEI

II.3. ETAPELE CARCINOGENEZEI CUTANATE

II.4. FACTORII DE RISC

CAPITOLUL III: DATE NOI PRIVIND GENEZA MELANOMULUI MALIGN CUTANAT

III.1. INTRODUCERE

III.2. CĂI MOLECULARE ÎN TUMORIGENEZA MELANOMULUI

III.3. TUMORIGENETICA ÎN MELANOM

III.4. ALTERAREA RĂSPUNSULUI IMUN ÎN MELANOM

CAPITOLUL IV: DIAGNOSTICUL MELANOMULUI MALIGN CUTANAT

IV.1. DIAGNOSTICUL CLINIC

IV.2. DIAGNOSTICUL HISTOPATOLOGIC

IV.3. STADIALIZAREA MELANOMULUI MALIGN

IV.4. ASPECTE IMUNOHISTOCHEMICE

IV.5. DERMATOSCOPIA

IV.6. MICROSCOPIA CONFOCALĂ DE REFLECTANȚĂ (MCR)

IV.7. EVALUAREA IMAGISTICĂ

IV.8. INVESTIGAȚIILE DE LABORATOR

CAPITOLUL V: FACTORII DE PROGNOSTIC ÎN MELANOMUL MALIGN CUTANAT

V.1. INTRODUCERE

V.2. DEFINIȚIE

V.3. FACTORI DE PROGNOSTIC LEGAȚI DE TUMORĂ

V.4. FACTORI DE PROGNOSTIC LEGAȚI DE GAZDĂ

V.5. FACTORI DE PROGNOSTIC LEGAȚI DE TRATAMENT

V.6. CONCLUZII

CAPITOLUL VI: IMPLICAȚIILE TERAPEUTICE ALE BIOMARKERILOR ÎN MELANOM

CONTRIBUȚII PERSONALE

CAPITOLUL VII: STUDIUL CLINIC AL MELANOMULUI MALIGN CUTANAT

VII.1. MATERIAL ȘI METODĂ

VII.2. REZULTATE

VII.3. DISCUȚII

CAPITOLUL VIII: STUDIUL HISTOPATOLOGIC ȘI AL CORELAȚIILOR MORFOCLINICE

VIII.1. INTRODUCERE

VIII.2. MATERIAL ȘI METODE

VIII.3. REZULTATE

VIII.4. DISCUȚII

CAPITOLUL IX: STUDIUL IMUNOHISTOCHEMIC

IX.1. INTRODUCERE

IX.2. MATERIAL ȘI METODE

IX.3. REZULTATE

IX.4. DISCUȚII

CAPITOLUL X: CONCLUZII FINALE

BIBLIOGRAFIE

CUVINTE CHEIE: melanom malign cutanat, carcinogeneză, factori de risc, căi moleculare, oncogene, biomarkeri, imunohistochimie, parametri prognostici, stres oxidativ, radiatii UV.

INTRODUCERE

Creșterea semnificativă a incidenței cancerului în ultimele trei decenii a devenit o realitate pentru aproape toate țările lumii, confirmată prin cercetări clinice și statistice de necontestat.

Dintre tumorile cutanate maligne, cele mai frecvente sunt epitelioamele, reprezentând 90-95% din total, dar și cele mai puțin grave. Melanoamele maligne, deși sunt mult mai rare (5%), sunt foarte grave, fiind responsabile de majoritatea deceselor prin cancer cutanat.

Statisticile Organizației Mondiale a Sănătății arată o incidență crescută a melanomului malign cutanat în ultimul deceniu, în fiecare an raportându-se 132 000 de cazuri noi la nivel global. Deoarece nivelele de ozon sunt în continuă scădere, iar atmosfera își pierde din ce în ce mai mult funcția de filtru protector, tot mai multe radiații UV solare ajung la suprafața Pământului. S-a estimat, astfel, că o scădere cu numai 10% a nivelului de ozon poate duce la apariția a 4500 de melanoame maligne cutanate.

Cu toate că nu este o tumoră exclusiv a pielii, melanomul malign cutanat reprezintă 95% din totalul melanoamelor, punând cele mai serioase probleme de prognostic. Studiile clinice arată o apariție precoce a acestei tumori, care evoluează rapid și cu mortalitatea cea mai ridicată, înscriind astfel melanomul pe primul loc din punct de vedere al agresivității și evoluției nefaste.

Datorită complexității biologice a melanomului malign, problema principală rămâne cum să traducem acești markeri clinico-morfologici și imunohistochimici de înaltă relevanță într-un beneficiu pentru pacienții cu melanom malign. Soluția rezidă în identificarea adevăratului „călcâi al lui Ahile” biologic pentru fiecare subtip de melanom. Cel mai probabil, abordările melanomului malign, folosind tehnologia secolului XXI a profilului genetic, vor duce la rezultate interesante.

STADIUL CUNOAȘTERII

Cancerul este o afecțiune complexă, declanșată atât de factori intrinseci (genetici, imunologici, hormonali, produși de însăși tumora malignă), cât și de factori extrinseci (fizici, chimici, virali, fumatul, traumatismul), care determină apariția unor mutații la nivelul unor gene.

În general, nu trebuie neglijat faptul că expunerile repetate, uneori exagerate la razele UV, reprezintă un real factor de risc, prin efectul cumulativ. Expunerea la soare în copilărie, uneori excesivă, explică apariția melanomului malign (MM) în număr mare la tineri. S-a recunoscut că factorul cel mai important în geneza acestei tumori este radiația solară.

La ora actuală, se cercetează în detaliu numeroasele evenimente moleculare, care pot duce la dezvoltarea acestei tumori. Numărul imens de reacții moleculare, care se petrec în cascadă și alterările care se asociază cu transformarea malignă în melanom, au făcut atât de complicată înțelegerea biologiei acestui tip de cancer.

Evenimentul primar care inițiază transformarea melanocitelor constă în modificările celulare moștenite clonal, care contribuie la malignizare. Acestea sunt rezultatul activării oncogenice prin modificări genetice (mutații genice, deleții, amplificări sau translocații) sau prin evenimente epigenetice (modificări ereditare, altele decât cele care afectează secvența de ADN, modularea transcripțională prin metilarea ADN-ului sau alterările cromatinei prin modificarea histonelor). Acest tip de modificări pot produce clone melanocitare, cu avantaj proliferativ față de celulele învecinate. În modificările clonale primare, s-au evidențiat mai multe căi (pathway-uri), cum ar fi cele care induc proliferarea celulară (calea proliferativă), sau căile care evită senescența celulară (pathway-ul senescenței celulare). Apoptoza poate constitui un proces foarte selectiv, sau chiar necesar pentru dezvoltarea MM avansat (calea apoptotică).

Studiul răspunsului imun în MM cutanat cuprinde două categorii principale de cercetare: celulele imune și factorii umorali, care cuantifică eficiența răspunsului antitumoral. Studiul biomarkerilor imuni în MM este interesant datorită implicării duale a sistemului imunitar în dezvoltarea tumorii. Markerii imuni pot fi folosiți, pe deoparte, pentru cuantificarea răspunsului imun antitumoral, iar, pe de altă parte, datorită supresiei imune demonstrate, pot fi ținte terapeutice.

În cazul apariției MM, mecanismele de imunosupresie sunt declanșate de melanocitul transformat neoplazic și/sau de factorii imuni, ce blochează răspunsul imun de supraveghere antitumorală de la nivelul pielii.

Celulele transformate neoplazic migrează, în diferite țesuturi, dezvoltând metastaze, în primul rând în ganglionii limfatici regionali, ca leziuni satelit sau în tranzit și apoi, în alte organe și țesuturi, în formele avansate, prin circulația limfatică și mecanismele de chemotaxie.

Markerii imuni tisulari și circulanți se corelează cu etapele evolutive ale procesului tumoral: inițierea procesului tumoral; angiogeneza; metastazarea; răspunsul imun antitumoral.

Din multitudinea de biomarkeri imuni studiați de-a lungul timpului, nu au fost încă găsiți acei markeri predictivi, de o imperioasă necesitate pentru decelarea eficienței terapeutice în MM cutanat.

Informațiile recent dobândite, privind importanța funcțională a genelor mutante, într-o proporție mare în MM, a schimbat fundamental abordarea diagnostică și terapeutică. În ceea

ce privește focusarea pe BRAF, N-RAS, KIT și PTEN, patru alterări genomice cheie și pathway-urile lor corespunzătoare, au extins înțelegerea complexității biologice uluitoare a MM.

În timp ce carcinogeneza MM este, încă, prea puțin înțeleasă, în complexitatea ei, pentru a preconiza când, cum și ce fel de mutație dezvoltă o tumoră metastatică sau invazivă, analiza genomului tumorilor primare sau metastatice va schimba, fără îndoială, viitoarele clasificări și, ca urmare, schemele de tratament.

În bilanțul primar al MM cutanat, se remarcă o ierarhizare a mijloacelor clinice și paraclinice, ce trebuie utilizate pentru stabilirea unui diagnostic cât mai exact, mai complet și mai precoce, fapt extrem de important pentru opțiunea cea mai corectă de management terapeutic.

Lista coordonatelor obligatorii histopatologice conține elemente care, în marea lor majoritate, sunt fie criteriile de stabilire a stadiului tumoral (grosimea, ulcerația, prezența nodulilor secundari, a metastazelor limfoganglionare sau a celor în tranzit), fie factori de prognostic (rezeția incompletă sau cu margine de siguranță oncologică insuficientă, ulcerația, indexul mitotic, regresia, invazia vasculară etc.).

Studiul imunohistochimic presupune utilizarea a numeroși markeri celulari generali (vimentina, proteina S100), markeri de proliferare celulară (Ki-67, PCNA), markeri de reglare a ciclului celular (Ciclina D1), molecule de adeziune celulară și markeri melanocitari (HMB45, Melan-A, tirozinaza, MITF, TRP2).

Din cauza nespecificității markerilor melanocitari, au fost realizate cocktailuri pan-melanom, care cuprind HMB45 + Melan-A/MART-1 + Tirozinază sau Melan-A/MART-1 + Tirozinază. Datorită rezultatelor promițătoare, TRP2 urmează a fi introdusă într-un nou cocktail pan-melanom, necesar pentru evidențierea invaziei intraepidermice la MM amelanotice.

Dermatoscopia face posibilă identificarea unor structuri specifice MM, care ne îngăduie să îl diferențiem de alte tumori, orientând diagnosticul. Microscopia confocală de reflectanță este o metodă modernă de vizualizare a pielii, in vivo, care face posibilă examinarea neinvazivă a morfologiei tumorilor cutanate, la o rezoluție asemănătoare cu cea a microscopiei optice.

În ciuda tuturor eforturilor terapeutice și de prevenție, MM rămâne, totuși, cel mai agresiv și mortal cancer de piele uman, de o reală complexitate. Campaniile de prevenție primară au ajuns deja, într-o oarecare măsură, să obțină un diagnostic mai precoce al tumorilor, cu un prognostic mai bun. Cu toate acestea, rata incidenței MM este în creștere, în toată lumea, în special datorită obiceiului de expunere nechibzuită la soare, întâlnit, mai ales, la adulții tineri.

Odată diagnosticat, prognosticul și terapia sunt grevate de o serie de factori de risc clinico-patologici, cum ar fi: grosimea tumorii, starea ganglionului limfatic santinelă, ulcerația și rata mitotică.

De la primele publicații făcute de Breslow și Clark în anii 1960 și 1970, cunoștințele despre factorii prognostici în MM au crescut dramatic, datele cele mai pertinente aparând, în principal, în ultimul deceniu. Deși rata ridicată a mortalității este încă asociată cu MM, aceasta ar putea sugera că progresele au fost fără rezultate, totuși un obiectiv terapeutic eficient este mult mai aproape decât înainte. Un astfel de progres este lăudabil având în vedere absența aproape completă a oricărui tratament eficient până de curând.

În ciuda câtorva noi agenți promițători, nu există, încă, strategii terapeutice care să cuprindă complexitatea căilor ce conduc la o agresivitate crescută în MM. Luând în considerare câteva teste multimarker, folosind probe *in vivo* și culturi celulare de MM primar și metastazat împreună, dezvoltarea MM implică câteva sute de gene, care sunt prea numeroase pentru a fi individualizate pentru o terapie țintită la un singur pacient, chiar dacă noi markeri genetici au fost identificați și sunt în prezent testați.

Apariția rezistenței, efectelor secundare nedorite și progresiei tumorale rapide după un răspuns inițial favorabil la tratament, cresc importanța unei clasificări riguroase genotipale și a terapiei sinergice focusate. Prin urmare, este necesară dezvoltarea unei ierarhii a oncogenelor, cu diferențiere între cele principale și secundare.

CONTRIBUȚII PERSONALE

1. MOTIVAȚIA, SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII

În prezenta lucrare ne-am propus un studiu retrospectiv amănunțit clinic, histologic și imunohistochimic, al unui număr de 110 pacienți, internați în Spitalul Clinic Județean de Urgență Craiova, cu diagnosticul de melanom malign cutanat, pe o perioadă de cinci ani (2012-2016).

Scopul acestui studiu a fost evidențierea importanței parametrilor clinico-morfologici și a markerilor imunohistochimici (CD 117, 4-HNE și Ki-67), cu implicații tumorigenice, prognostice, cât și terapeutice în melanomul malign cutanat.

În ceea ce privește cancerul în general, speciile reactive de oxigen au fost intens studiate într-o serie largă de cancere umane, fiind însă puțin analizate în melanoamele maligne cutanate, în special prin prisma 4-hidroxinonenalului (4-HNE), produs de peroxidare lipidică, motiv pentru care am ales să introducem acest marker în lucrarea de față, el constituind un **element de noutate** în aceste neoplazii, cât și în studiul nostru. În plus, analizele comparative ale expresiei 4-HNE în leziunile melanocitare benigne și maligne (primare sau metastatice) umane, nu au mai fost efectuate până la cercetarea de față.

2. STUDIUL CLINIC AL MELANOMULUI MALIGN CUTANAT

A avut în vedere următoarele **obiective**:

1. Stabilirea distribuției cazuisticii studiate în funcție de factorii de prognostic clinici, precum sexul, vârsta, mediul de proveniență al pacienților, localizarea și vechimea leziunilor cutanate, cât și corelațiile dintre acestea;

2. Prevalența formelor clinice de melanom malign în regiunea noastră geografică și corelația lor cu parametrii clinici;

3. Ponderea expunerii la radiațiile UV – ca factor de risc esențial în declanșarea procesului malign și repartitia cazurilor în funcție de fototipul pacienților;

4. Demonstrarea importanței traumatismului la locul leziunii în transformarea malignă și prezenței formațiunilor nevice ca entități premergătoare apariției melanomului;

5. Corelația metastazelor cu parametri clinici precum sexul, vârsta și localizarea leziunii.

Material și metodă. Pentru fiecare din cele 110 cazuri studiate, s-a întocmit câte o fișă individuală, menționând, pe lângă datele personale, respectiv vârsta, sexul, profesia,

mediul de proveniență și un număr de alte observații cu privire la: diagnosticul clinic, localizarea MM, vechimea leziunii, dimensiunea, fototipul, expunerea la radiațiile UV, MM dezvoltat pe nev preexistent, prezența traumatismului ca factor de risc, asocierea cu alte leziuni cutanate, aspecte dermatoscopice.

Datele au fost prelucrate statistic, folosind Microsoft Excel - pentru statistica descriptivă și SPSS - pentru statistica inferențială.

Examenul dermatoscopic s-a efectuat cu un dermatoscop de tip FotoFinder și un altul de tip MoleMax HD 1.5, la 19 pacienți, dintre care 10 cazuri din lotul studiat și 9 cazuri dintr-un lot comparativ.

Rezultate și discuții. Cele mai multe cazuri au fost întâlnite în 2012, 27%, fapt ce ar putea fi corelat cu radiațiile UV excesive datorate exploziilor solare din acea perioadă. Majoritatea cazurilor studiate s-au încadrat în fototipul II (56%) și au recunoscut expunerea excesivă în antecedente la radiațiile UV (67%), principalul factor de risc în apariția MM. Un alt factor de risc care s-a asociat cu expunerea la UV a fost traumatismul leziunilor, în special al nevilor (58%).

69% din totalul pacienților au provenit din mediul urban, deoarece adresabilitatea pacienților și accesibilitatea serviciilor medicale este semnificativ mai mare decât în cel rural.

Merită de subliniat faptul că majoritatea melanoamelor maligne (75%) s-au dezvoltat *de novo* și nu pe formațiuni nevice preexistente, în conformitate cu statisticile de specialitate.

În cazuistica studiată am întâlnit următoarele forme clinice de MM cutanat și anume: MM extensiv în suprafață (49%), MM nodular (35%), melanomul lentiginos acral (6%), MM acrom (6%), melanom lentigo malign (3%) și un caz particular de melanom pe nev albastru (1%).

Vârsta medie de apariție a MM cutanat în lotul studiat de noi a fost 62 ani, cu observația că 22% din pacienți au avut vârsta sub 50 ani, iar până în 30 ani au fost afectate numai femeile (3%). Această constatare ar putea avea ca justificare reducerea stratului de ozon, cu creșterea nocivității razelor UV, precum și tendința tinerilor de a se expune excesiv la soare sau în cabinetele de bronzare artificială.

Am constatat că MM extensiv în suprafață a fost mai frecvent, atât la femei, cât și la bărbați, în grupa de vârstă 51-60 ani. În ceea ce privește MM nodular, acesta a fost mai frecvent la grupa de vârstă 71-80 ani la sexul masculin, în timp ce la sexul feminin, grupa de vârstă la care am întâlnit cele mai multe cazuri de MM nodular a fost 51-60 ani. Cele două forme clinice, respectiv melanomul lentigo malign și melanomul lentiginos acral nu au apărut până la vârsta de 50 ani.

Cât privește distribuția MM cutanat pe sexe, datele noastre arată o incidență aproximativ egală, cu o discretă predominanță a sexului feminin, respectiv 52% față de 48% la sexul masculin. În ceea ce privește subtipurile clinice de melanom, MM extensiv în suprafață a predominat la sexul feminin, în timp ce MM nodular a avut o prevalență egală.

Cele mai multe MM au fost localizate la nivelul trunchiului (50%), urmate de membrele inferioare (23%) și regiunea capului (21%). Aceste localizări au fost strâns corelate cu profesia pacienților, care presupunea o expunere prelungită la radiațiile solare (capul și trunchiul), precum și la traumatisme repetate (membrele inferioare).

Melanoamele studiate s-au asociat cel mai frecvent cu leziuni precum nevii displazici (12%) în cazurile de MM nodular și cu keratozele actinice faciale (10%) în cazurile de MM extensiv în suprafață. Am remarcat, de asemenea, că majoritatea leziunilor aveau o vechime

de până la 1 an și dimensiuni mai mici de 1 cm², ceea ce ne arată că peste jumătate din pacienți s-au adresat medicului la scurt timp de la apariția tumorii.

Din corelația metastazelor cu parametrii clinici, am constatat că la grupa de vârstă 61-70 ani există cel mai crescut risc de metastazare, mai afectat este sexul masculin și formele de MM cu localizare la nivelul trunchiului.

În studiul nostru, examenul dermatoscopic s-a efectuat la 19 pacienți, dintre care 10 cazuri de MM cutanate primare au făcut parte din lotul studiat. Celelalte 9 cazuri, 8 nevi (nevocelulari, congenital, displazici, albastru) și un melanom *in situ*, au constituit pentru studiul de față un lot comparativ, în vederea scoaterii în evidență a trăsăturilor caracteristice dermatoscopice ale leziunilor cutanate pigmentare benigne față de cele maligne, dermatoscopia având un rol esențial în depistarea precoce a leziunilor melanocitare cu potențial de transformare malignă.

3. STUDIUL HISTOPATOLOGIC ȘI AL CORELAȚIILOR MORFOCLINICE

Obiective. Acest studiu a urmărit stabilirea corelațiilor dintre o serie de parametrii histopatologici cu implicații prognostice la pacienții cu melanom:

1. subtipul histopatologic de melanom;
2. nivelul de invazie Clark;
3. indexul de grosime Breslow;
4. stadiul pTNM la momentul diagnosticului;
5. prezența/absența ulcerăției;
6. prezența/absența necrozei tumorale;
7. intensitatea infiltratului inflamator intra- și peritumoral;
8. metastazele locoregionale sau la distanță apărute în intervalul desfășurării studiului.

Material și metodă. Dintre cele 110 cazuri de MM analizate, 20 de cazuri (18,18%) au prezentat metastaze locoregionale sau la distanță, fie la momentul diagnosticului, fie apărute în intervalul de timp de 5 ani (2012-2016) în care s-a desfășurat acest studiu. Toate aceste metastaze au fost confirmate prin examen histopatologic și au fost incluse în studiu.

Țesuturile provenite de la tumorile primare și de la metastaze au fost prelucrate utilizând tehnica histologică uzuală de includere la parafină și colorate standard cu Hemalaum-Eozină.

Metoda de analiză statistică a utilizat valori medii și intervale de încredere, precum și teste de comparație pentru loturile constituite, realizate cu ajutorul softului SPSS10. Testul Chi pătrat a fost utilizat pentru a interpreta tabelele de incidență.

Rezultate și discuții. Principalele patru subtipuri histopatologice ale MM cutanat respectă prevalența standard a acestor tumori la populația albă cu excepția melanomului lentiginos acral, o formă agresivă de MM cutanat, care a fost mai frecvent, în defavoarea melanomului lentigo malign și a metastazat în peste jumătate din cazuri (57,14% din cazuri).

Metastazele de MM cutanat sunt mai frecvente la nivelul ganglionilor limfatici regionali (75%), urmate de metastazele cutanate la distanță (15%) și apoi de cele satelite și viscerale.

Subtipul histopatologic de MM nodular se corelează semnificativ cu metastazele ($p=0,0032$), probabil ca urmare a indicelui de grosime mai mare decât la oricare alt subtip histopatologic.

Majoritatea covârșitoare a pacienților au fost diagnosticați cu un nivel de invazie Clark peste III (98 de cazuri, 89,1%) și un indice Breslow peste 2 mm (74 de cazuri, 62,27%), cel mai probabil ca urmare a prezentării tardive la medicul specialist.

Nu există corelații semnificative ale nivelului de invazie Clark cu metastazele de MM cutanat ($p=0,303$), dar metastazele sunt mai frecvente pe măsură ce acest nivel de invazie crește. În schimb, indicele de grosime Breslow poate prezice cu mare exactitate riscul metastazării ganglionare, melanoamele cu un indice Breslow de peste 2 mm corelându-se înalt semnificativ statistic ($p=0,0034$) cu dezvoltarea metastazelor.

Metastazele au apărut mult mai frecvent la cazurile care prezentau tumori ulcerate (70% dintre metastaze s-au dezvoltat la cazurile cu tumori ulcerate), comparativ cu cele fără ulcerare (30%), fără ca diferența să fie, însă, semnificativă statistic ($p=0,922$), dar ulcerarea din MM ar putea reflecta o creștere rapidă a tumorii.

Apariția metastazelor s-a corelat înalt semnificativ statistic ($p=0,00412$) cu existența zonelor de necroză tumorală la nivelul tumorilor primare, metastazele fiind de 4,8 ori mai frecvente la pacienții care prezentau necroză tumorală la nivelul MM primar ($OR=4,846$) comparativ cu cei la care nu s-au identificat focare de necroză. Astfel, se pare că necroza ar putea să aibă o mai mare influență asupra prognosticului comparativ cu ulcerarea.

Analiza prevalenței metastazelor în funcție de intensitatea infiltratului inflamator peri- și intratumoral evidențiază faptul că, cu cât infiltratul inflamator are o intensitate mai mare, cu atât prevalența metastazelor este mai mică, fără o corelație semnificativă statistic ($p=0,269$), sugerând că modul în care gazda generează o reacție de apărare (infiltratul inflamator) în tumora primară, ar putea fi cercetat și utilizat pentru a dezvolta terapii ale metastazelor de melanom.

Metastazele se asociază înalt semnificativ cu stadiile \geq II ($p=0,00594$) sugerând importanța majoră a diagnosticării melanomului în stadii incipiente, 0 sau I.

4. STUDIUL IMUNOHISTOCHIMIC

Obiective. Studiul unor markeri imunohistochimici (CD 117, 4-HNE, Ki-67) care evaluează progresia tumorală și prognosticul. Analizele comparative ale expresiei produsului de peroxidare lipidică, 4-HNE, în leziunile melanocitare benigne și maligne (primare sau metastatice) umane nu au mai fost efectuate până în prezent, constituind **elementul de originalitate** al lucrării.

Material și metodă. Studiul imunohistochimic a fost efectuat pe un număr de 55 de cazuri, reprezentate de un lot martor, care a inclus 5 cazuri de nevi simpli și 5 cazuri de nevi cu leziuni displazice, precum și de un lot de studiu, alcătuit din 35 cazuri de MM primar și 10 metastaze (una intestinală, 3 cutanate – una satelită și două la distanță, precum și 6 în ganglionii limfatici). Lotul de studiu, a fost selectat din cele 110 cazuri de MM analizate clinico-morfologic și a inclus 15 cazuri de MM extensiv în suprafață, 10 cazuri de MM nodular, 3 cazuri de melanom lentigo malign, 3 cazuri de melanom lentiginos acral și 4 cazuri de MM acrom. Metoda de studiu imunohistochimică utilizată pentru identificarea epitopilor de

interes a fost una în doi timpi, cu polimer, care prezintă sensibilitate înaltă, specificitate și afinitate ridicate.

Metodele de analiză statistică au utilizat valori medii și intervale de încredere, precum și teste de comparație (Chi pătrat) pentru loturile constituite, realizate cu ajutorul softului SPSS10.

Rezultate și discuții. CD 117 (c-kit) este puternic implicat în procesul de tumorigeneză al MM cutanate, fiind nedetectabil imunohistochimic în leziunile nevice benigne, dar intens exprimat în leziunile displazice (nevi displazici) și ariile de melanom *in situ*.

În MM cutanate invazive, expresia CD 117 are tendința de a scădea pe măsură ce neoplazia progresează și trece în faza tumorigenă, de creștere verticală, fiind mai redusă în componenta dermică profundă a tumorilor și în MM nodulare.

Pentru a scăpa de barierele epidermice și a obține un avantaj proliferativ care să permită trecerea în faza de creștere verticală, se pare că melanomul malign ar trebui să piardă expresia c-kit.

Metastazele de MM cutanat exprimă CD 117 la un nivel comparabil cu tumorile lor primare, sugerând că alte mecanisme intervin direct în procesul de metastazare și nu pierderea expresiei c-kit prin ea însăși.

Supraexpresia CD 117 în leziunile melanocitare cutanate ($\geq 10\%$ din celulele tumorale) se corelează semnificativ cu o intensitate crescută a imunomarcajului (+2/+3), sugerând că evaluarea imunohistochimică a CD 117 poate constitui o metodă bună pentru screeningul pacienților, ce ar putea beneficia de o terapie personalizată cu inhibitori de tirozin kinază.

Expresia 4-HNE, produs de peroxidare lipidică, ca urmare a stresului oxidativ, este semnificativ crescută în nevi displazici comparativ cu nevi comuni (benigni) ($p < 0,05$) și se menține la un nivel comparabil cu cel din leziunile displazice în cazul MM cutanate ($p > 0,05$).

4-HNE intervine precoce în procesul de tumorigeneză al MM cutanate, supraexprimându-se puternic, odată ce melanocitele au suferit modificări displazice. Metastazele pierd produsul de peroxidare lipidică 4-HNE, aspect ce se corelează cu activitatea proliferativă crescută detectată în metastazele de MM cutanat.

Există diferențe semnificative ale ratei proliferative, determinate imunohistochimic cu ajutorul ki-67, între nevi comuni și cei displazici, precum și între nevi displazici cutanați și melanoamele maligne, fracția de creștere fiind astfel un indicator al progresiei neoplazice în cazul leziunilor melanocitare cutanate. În același timp, imunomarcajul la ki-67 are un rol diagnostic major în cazul leziunilor melanocitare cutanate, el contribuind semnificativ la realizarea distincției între leziunile benigne, displazice și maligne.

Evaluarea preterapeutică a expresiei Ki-67 devine din ce în ce mai importantă în evaluarea agresivității tumorale și stabilirea tratamentului adecvat, ki-67 fiind un marker robust și un puternic indicator prognostic în MM cutanate, care ar putea permite selectarea pacienților cu tumori cu rată proliferativă foarte ridicată ce necesită o terapie diferențiată.

Pe lângă rolul diagnostic și prognostic, Ki-67 este, de asemenea, un candidat promițător pentru noi terapii ale MM cutanat care să implice eventual sisteme de tip oligonucleotide antisens (ki-67-ASO), acizi nucleici peptidici anti-ki-67 (PNA anti-ki 67), sisteme adenovirus oncolitic-ARN sau cu anticorpi anti-ki-67 care au fost deja studiate și aplicate în alte tipuri de cancere umane.

CONCLUZII FINALE

1. Principalul factor de risc în apariția melanomului malign în lotul studiat de noi a fost expunerea excesivă, în antecedente, la **radiațiile UV**; până la vârsta de 30 de ani au fost afectate numai femeile, ca urmare a tendinței de a utiliza cabinele de bronzare artificială; un alt factor de risc care s-a asociat cu expunerea la UV a fost traumatismul leziunilor, în special al nevilor;
2. Majoritatea cazurilor de melanom malign s-au dezvoltat *de novo*, afectând în special **femeile**, la o vârstă medie de **62 ani**, iar forma clinică cea mai frecvent întâlnită a fost melanomul malign **extensiv în suprafață**, cu localizare preponderent la nivelul **trunchiului**;
3. Ca factor de prognostic negativ în melanomul malign, **metastazele** ocupă un loc princeps, cele mai frecvente fiind la nivelul ganglionilor limfatici regionali. Subtipul de melanom malign nodular s-a corelat semnificativ cu metastazele;
4. Prognosticul melanoamelor maligne cutanate primare și, în consecință, conduita terapeutică, sunt grevate de o serie de **parametrii morfoclinici**, dintre care cei mai importanți sunt: indexul de grosime Breslow, prezența necrozei tumorale, stadiul melanomului la momentul diagnosticului și subtipul histopatologic;
5. **Stresul oxidativ** este implicat în inițierea și progresia melanoamelor cutanate prin intermediul produșilor de peroxidare lipidică de tipul alchenelor bioactive, cum este 4-hidroxinonenalul (4-HNE) generat la nivel mitocondrial, care determină reprogramarea metabolică a celulelor. Manipularea generării speciilor reactive de oxigen poate fi o abordare viabilă pentru prevenirea și tratarea melanomului malign în viitor.
6. **CD 117** (c-kit), **4-HNE** și **Ki-67** sunt markeri puternic implicați în tumorigeneza, diagnosticul și prognosticul melanomului malign cutanat, putând fi, totodată, o nouă generație importantă de agenți terapeutici.

MULȚUMIRI

Această lucrare a beneficiat de finanțare prin proiectul „Program de excelență în cercetare doctorală și postdoctorală multidisciplinară în bolile cronice”, contract nr. POSDRU/159/1.5/S/133377, proiect cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Aldini G., Carini M., Yeum K.-J., Vistoli G., Novel molecular approaches for improving enzymatic and nonenzymatic detoxification of 4-hydroxynonenal: toward the discovery of a novel class of bioactive compounds, *Free Radical Biology and Medicine*, 69(0), 145–156, 2014
2. Alecu M., Coman G., Coman A.O. et al., Biomarkeri pentru aprecierea prognosticului în melanomul malign, *Dermatovenerol.*, București, 57, 155-168, 2012

3. Bailey E.C., Sober A.J., Tsao H., Cap 124. „Cutaneous Melanoma” în Goldsmith L.A., Katz S.I., Gilchrest B.A. et al., Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 8th Edition, vol. 1, Ed. McGrawHill Medical, 2012
4. Baroudjian B., Pagès C., Lebbé C., Melanoma, from diagnosis to treatment, Rev. Infirm., (219):16-8, 2016
5. Barrera G., Pizzimenti S., Ciamporcerio E.S., Daga M., Ullio C., Arcaro A. et al., Role of 4-hydroxynonenal-protein adducts in human diseases, Antioxidants & Redox Signaling, 2014
6. Bellot G.L., Liu D., Pervaiz S., ROS, autophagy, mitochondria and cancer: Ras, the hidden master?, Mitochondrion, 13(3), 155–162, 2013
7. Berwick M., Buller D.B., Cust A. et al., Melanoma Epidemiology and Prevention, Cancer Treat. Res., 167:17-49, 2016
8. Borgenvik T.L., Karlsvik T.M., Ray S. et al., Blue nevus-like and blue nevus-associated melanoma: a comprehensive review of the literature, ANZ J. Surg., 87(5):345-349, 2017
9. Cosgarea R., Stăniceanu F., Zurac S., Baican C.I. et al., cap. 12 „Melanomul” în Boda D. (coord.), Tratat de Dermato-Oncologie, Ed. Univ. Carol Davila, București, 593-696, 2012
10. Fernandez-Flores A., Prognostic factors for melanoma progression and metastasis: from Hematoxylin-Eosin to genetics, Rom. J. Morphol. Embriol., 53(3), 449-459, 2012
11. Ilie M.A., Boda D., Zurac S.A. et al., Microscopia confocală in vivo – o fereastră deschisă spre microstructura pielii, în Brănișteanu D.E., Patologia Dermatologică la granița dintre specialități, Ed. Junimea, Iași, 26-34, 2017
12. Kruijff S., Hoekstra H.J., The current status of S-100B as a biomarker in melanoma, Eur. J. Surg. Oncol., 38(4), 281-285, 2012
13. Ladstein R.G., Bachmann I.M., Straume O. et al., Tumor Necrosis Is a Prognostic Factor in Thick Cutaneous Melanoma, American Journal of Surgical Pathology, 36(10), 1477–1482, 2012
14. Li L.T., Jiang G., Chen Q., Zheng J.N., Ki-67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review), Molecular Medicine reports, 11:1566-1572, 2015
15. Maranduca M.A., Șerban I.L., „Fiziologia pielii” în Brănișteanu D.E., Patologia Dermatologică la granița dintre specialități, Ed. Junimea, Iași, 1-16, 2017
16. Minocha R., Damian D.L., Halliday D.M., Melanoma and non-melanoma skin cancer chemoprevention: a role for nicotinamide?, Photodermatol. Photoimmunol. Photomed., 1-8, 2017
17. Nandy A., Sumit K.D., Sujata D. et al., Gold (I) N-heterocyclic carbene complex inhibits mouse melanoma growth by p53 upregulation, Molecular Cancer, 13(57), 1-14, 2014
18. Nichols E.E., Richmond A., Daniels A.B., Tumor Characteristics, Genetics, Management, and the Risk of Metastasis in Uveal Melanoma, Semin. Ophthalmol., 31(4):304-9, 2016
19. Nielsen P.S., Riber-Hansen R., Jensen T.O. et al., Proliferation indices of phosphor-histone H3 and Ki-67: strong prognostic markers in a consecutive cohort with stage I/II melanoma, Mod. Pathol., 26(3):404-13, 2013
20. Pierard G.E., Cell Proliferation in Cutaneous Malignant Melanoma: Relationship with Neoplastic Progression, International Scholarly Research Network, ISRN Dermatology, 2012:1-12, 2012

21. Pierard G.E., Piérard-Franchimont C., Delvenne P., Simulants of malignant melanoma, *Oncology reviews*, vol. 9:278, 2015
22. Pizzimenti S., Ciamporcero E., Pettazzoni P. et al., The inclusion complex of 4-hydroxynonenal with a polymeric derivative of β -cyclodextrin enhances the antitumoral efficacy of the aldehyde in several tumor cell lines and in a three-dimensional human melanoma model, *Free Radic. Biol. Med.*, 65:765-77, 2013
23. Pung P.P., Sarlomo-Rikala M., La Sota J. et al., Immunohistochemical analysis of 1563 tumors including metastatic, desmoplastic and mucosal melanomas and their mimics. *Am.J.of Surg. Pathol.*, 36(2), 265-292, 2012
24. Reginster M.A., Pierard-Franchimont C., Pierard G.E. et al., Molecular dermatopathology in malignant melanoma, *Dermatology Research and Practice*, Article ID 684032, 6 pag., 2012
25. Ribero S., Longo C., Glass D. et al., What Is New in Melanoma Genetics and Treatment?, *Dermatology*; 232:259–264, 2016
26. Shoeb M., Ansari N.H., Srivastava S.K. et al., 4-hydroxynonenal in the pathogenesis and progression of human diseases, *Curr. Med. Chem.*, 21(2), 230–237, 2014
27. Thomas L., Prevention, early detection and monitoring of cutaneous melanoma, *Rev. Infirm.*, (219):19-22, 2016
28. Vogt N., Klapper W., Variability in morphology and cell proliferation in sequential biopsies of mantle cell lymphoma at diagnosis and relapse: clinical correlation and insights into disease progression, *Histopathology*, 62:334-342, 2013
29. Xavier J.C.C., Munhoz Souza V., de Campos E.B.P. et al., Focal invasiveness in complete histological analyses of a large acral lentiginous melanoma, *Diagnostic Pathology*, 10:73-77, 2015
30. Zhong H., Yin H., Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria, *Redox Biol.*, 4, 193–199, 2015