

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE CAROL DAVILA
BUCUREȘTI

FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ

REZUMAT TEZA DOCTORAT

Nevi melanocitari cutanați cu dezordini arhitecturale și atipii citologice (nevii displazici) – studiul morfologic complex

Conducător de doctorat

PROF. UNIV. DR. MARIA SAJIN

Student- Doctorand

Dr. PĂTRAȘCU OANA MARIA

București, 2017

Cuprins:

Lista abrevieri.....	5
Introducere.....	7
PARTEA GENERALĂ - Stadiul actual al cunoștințelor.....	10
Capitolul 1: Sistemul melanocitar – considerații generale:	
1.1. Aspecte embriologice și morfologice ale sistemului melanocitar; melanogeneza, transportul și rolul melaninei.11	
1.1.a: Aspecte embriologice ale sistemului melanocitar.....	11
1.1.b: Aspecte morfologice ale melanocitelor.....	13
1.1.c: Melanogeneza.....	15
1.1.d: Transportul și rolul melaninei.....	18
1.2. Histogeneza și morfologia celulelor nevice.....	21
1.3. Tumorile melanocitare- clasificare.....	22
Capitolul 2: Nevii displazici:	
2.1 Aspecte istorice, epidemiologice și de prognostic.....	26
2.2 Etiologia, mecanisme fiziopatologice și genetice.....	27
2.3 Diagnosticul clinic și histopatologic al nevilor displazici.....	29
2.4 Aspecte imunohistochimice.....	33
2.5 Aspecte de microscopie electronică.....	42
2.6 Diagnostic diferențial și management terapeutic.....	45
CONTRIBUȚII PERSONALE	
Capitolul 3: Bazele generale ale cercetării:	
3.1 Noțiuni introductive și motivația temei alese.....	49
3.2 Scopul și obiectivele generale ale cercetării.....	52
3.3 Material și metode de cercetare.....	54
3.3.1 Selecția cazurilor.....	54
3.3.2 Studiul morfologic.....	55
3.3.3 Studiul imunohistochimic.....	60
3.3.4 Studiul de microscopie electronică.....	62
Capitolul 4: Rezultate și discuții:	
4.1 Studiul clinic și epidemiologic	
4.1.1 Studiul clinic și epidemiologic al nevilor nevocelulari comuni.....	64
4.1.2 Studiul clinic și epidemiologic al nevilor displazici.....	79
4.1.3 Analiza comparativă a cele două loturi.....	89
4.2 Studiul morfologic al nevilor displazici.....	98
4.3 Studiul imunohistochimic și al corelațiilor între expresia imunohistochimică și caracteristicile morfologice ale nevilor displazici.....	132
4.4 Studiul corelațiilor între expresiile imunohistochimice a markerilor folosiți în cercetare.....	158
4.5 Aspecte de microscopie electronică.....	165
Capitolul 5: Concluzii generale.....	169
Capitolul 6: Perspective și direcții viitoare de cercetare.....	176
Bibliografie.....	179
Anexe.....	190

Acestă lucrare a beneficiat parțial de suport financiar prin proiectul CERO- Profil de carieră: Cercetător Român, proiect POSDRU/159/1.5/S/135760, proiect cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013

PARTEA GENERALĂ

Stadiul actual al cunoștințelor - Rezumat

Aspecte embriologice ale sistemului melanocitar

Melanocitele sunt celule dendritice responsabile de sinteza melaninei ce își au originea embriologică în creasta neurală. Toate celulele crestei neurale pot să se diferențieze în melanocite, însă celulele ce migrează pe direcția dorsolaterală vor fi cele ce vor da naște cu precădere melanocitelor [1]. Din multitudinea de factori ce intervin în dezvoltarea melanocitară subliniez gena MITF (microphthalmia - associated transcription factor) care este o genă cu importanță crescută, fiind activată de SOX10 și PAX3 [2], activând la rândul ei alte gene producătoare de pigment, precum dct sau tirozinaza și având un rol aparte în supraviețuirea melanoblaștilor, cu implicarea genei bcl2 [3]. Totodată, MITF este necesară dediferențierii melanocitare, având legături cu Tcf/Lef și cu calea de semnalizare Wnt, lipsa ei asociindu-se cu absența melanocitelor la șoareci și la pești, iar la oameni ducând la apariția sindroamelor Waardenburg sau Tietz [2].

Melanocitele mature sunt celule diferențiate, pierzându-și capacitatea migratorie [4], având localizare în epiderm, mai exact la joncțiunea dermo-epidermică, la nivelul foliculilor piloși, a leptomeningelui, a retinei, urechii sau alte mucoase de acoperire scuamoase precum și la nivelul mucoasei digestive. Regenerarea, migrarea și proliferarea melanocitară în epiderm de-a lungul vieții unui individ se poate observa după diferite traumatisme și își are originea în melanocitele din stratul bazal al foliculilor piloși după cum a fost demonstrat de Staricco și Mishima [5,6].

Aspecte morfologice ale melanocitelor

Melanocitele sunt celule dendritice, localizate cu predominanță la joncțiunea dermo-epidermică, în stratul bazal al epidermului, procesele lor dendritice extinzându-se în mai multe direcții [7] până în stratul spinos. Numărul melanocitelor epidermale variază între 1200/ mm² pe trunchi și 2900/mm² în regiunea feței, independent de rasă și culoarea pielii [4, 8,9]. Acestea se conectează cu aproximativ 30-40 de keratinocite, cu un raport melanocit: keratinocit de 1:10 [8,9] în medie, formând unitatea melano-epidermală, raport ce variază și acesta în funcție de regiunea anatomică dar care nu variază în funcție de rasă. Conexiunea melanocito-keratinocitară se realizează prin molecule de adeziune de tipul P și E-cadherinelor, precum și

prin diverse integrine [8,9] iar conexiunea melanocitară cu membrana bazală se realizează prin conexiuni de tip hemidesmozomi [10]. Raportul melanocit: keratinocit poate ajunge de la 1:30 la 1:4 în anumite localizări anatomice [10], frecvent în zonele pigmentare ale corpului. Culoarea tegumentară nu depinde de numărul melanocitelor ci, mai degrabă, de sinteza de melanină (melanogeneza), tipul de melanină sintetizată (eumelanină sau feomelanină) și de distribuția melanosomilor către keratinocit precum și de gradul de degradare a melanozomilor de către keratinocit [9].

Histogeneza și morfologia celulelor nevice

Histogeneza celulelor nevice, celulele ce formează nevii, nu este încă pe deplin cunoscută. Există mai multe teorii ce încearcă să explice originea acestor celule. Primul care a încercat să explice existența acestor variații și formarea nevilor a fost Paul Gerson Unna, în 1893, care a dezvoltat ideea că nevocitele apar ca urmare a „căderii” melanocitelor din epiderm, formând astfel cuiburi celulare fie joncționale, fie intradermice (teoria Abtropfung) [11-15]. Această teorie susține ideea că nevii joncționali se dezvoltă primii, apoi, cu înaintarea în vârstă, celulele cad mai în profunzime, nevul transformându-se într-unul compus și apoi în nev intradermic. În 1984, Stewart F. Cramer a dezvoltat teoria Hochsteigerung [14,15] susținând ca nevocitele apar ca urmare a migrării de pe fibrele nervoase a unor celule rămase blocate în timpul embriogenezei.

Tumorile melanocitare- clasificare

Modalitatea de apariție și evoluție a leziunilor melanocitare este în continuă dezbateră, discuțiile implicând atât geneza celulară cât și încadrarea acestor leziuni în categoria de neoplazii sau hamartoame. Actualmente, nevii sunt considerați tumori formate din celule nevice, variante morfologice ale melanocitelor, ce se dispun în cuiburi sau plaje la nivelul joncțiunii dermo-epidermale. Celulele progenitoare apar ca urmare a proliferării lentiginose a unei unități alcătuite dintr-o singură celulă situată pe stratul bazal, la nivelul creștelor epidermale, proliferarea prezentând pattern specific, în cuiburi, celulele se dediferențiază și își pierd din capacitatea de proliferare, iar activitatea metabolică scade considerabil, mai puțin în ceea ce privește formarea melanozomilor, și apoi cad în derm conform teoriei Abtropfung formând nevii dermici și compuși [12]. O altă ipoteză presupune că celulele nevice provin din nervii cutanați, dintr-o celulă pluripotentă [13, 16, 17]. În continuare, problema încadrării acestor leziuni în categoria tumorilor sau a malformațiilor (hamartoamelor) rămâne de actualitate, existând argumente pentru ambele încadrări [12, 13].

Clasificarea tumorilor melanocitare se poate face din punct de vedere clinic, dermatologic și histologic. Criteriile clinice iau în discuție dimensiunile tumorii, vârsta pacientului, antecedentele personale și familiale, localizarea anatomică și aspectele macroscopice: simetria leziunii, marginile leziunii, colorația tumorii, existența elevației sau a aspectului „en-dome”. Criteriile dermatoscopice urmăresc culoarea, dispoziția (pattern-ul) și modalitatea de distribuție a pigmentului [18]. Criteriile histologice cuprin localizarea melanocitară: superficială sau profundă. Stroma poate prezenta aspecte diverse, de la fibroză la desmoplazie sau aspecte mucinoase. De altfel, și tipul celular trebuie luat în considerare, existența maturizării celulare sau a neurotizării precum și forma celulară, fie ea epiteloidă sau fuziformă [12]. Leziunile melanocitare sunt împărțite în hiperplazii melanocitare, incluzând lentigo simplex sau solar, și neoplazii melanocitare – nevii [19]. Din melanocitele epidermale se dezvoltă efelidele și lentigo, din cele dermale iau naștere pata mongoloidă, nevii lui Ota și Ito și nevii albaștrii, iar celula de origine a nevilor este reprezentată de nevocit [11]. O altă clasificare împarte tumorile melanocitare în tumori congenitale (în care este inclus și nevul congenital) și nevi dobândiți.

Nevii displazici

Aspecte istorice, epidemiologice și de prognostic

Marea majoritate a articolelor îi atribuie prima descriere a nevilor displazici lui Clark și Reimer, în 1978, care a descris „nevii B-K” la pacienții cu istoric familial de melanom, denumindu-l astfel după cei doi pacienți studiați. În aceeași perioadă, Lynch și colaboratorii au descris același tip de leziune într-un context clinic asemănător, introducând notiunea de „sindrom familial melanocitar cu nevi multipli atipici” (FAMMM – Familial atypical multiple mole melanoma syndrome) [20,21]. La puțini ani distanță, Elder descrie „sindromul nevilor displazici” atât în asociere cu istoric familial dar și cu apariție sporadică [22]. În realitate însă, prima descriere a fost făcută de Norris, în 1829, și, mai târziu de Cowley, în 1950, care au descris diverse tipuri de melanoame familiale la pacienți ce prezentau multipli nevi melanocitari joncțional activi [23].

Prevalența și incidența nevilor displazici, precum și riscul relativ de apariție a melanomului malign, este extrem de greu de estimat, în principiu datorită corelațiilor slabe între criteriile histologice de diagnostic și fenotipul clinic, dar și ca urmare a existenței unor astfel de leziuni destul de frecvente în populația generală. Prevalența variază în funcție de articole și

de zona geografică din care provin pacienții. Astfel, unii estimează o prevalență de 1,5-18% [24] sau de 5-10 % în populația generală [23], ajungând până la 53% în alte articole [25]. În funcție de criteriile de diagnostic folosite, incidența variază, per total, între 2 și 50% [26]. Pentru pacienții caucazieni, incidența variază între 2-8% până la 17 % în Statele Unite ale Americii [26]. Riscul de apariție al melanomului este estimat în jur de 10-12% [23], unele studii susținând că 18 % dintre pacienții cu melanom non-familial prezintă nevi displazici [23], pe când altele calculează o incidență de 34-59% a nevilor displazici la pacienții cu melanom malign [25].

Etiologia, mecanisme fiziopatologice și genetice

Principalul factor etiologic incriminat în apariția și evoluția nevilor displazici este reprezentat de expunerea la radiațiile ultraviolete, mai ales cele de tip UVB. S-a dovedit că acestea duc la creșterea numărului de melanocite cu activitate mitotică și acționează pe materialul genetic prin distrugerea ADN-ului într-o măsură mai mare în contextul nevilor displazici comparativ cu nevi nevocelulari comuni [23, 27]. Totodată, stresul oxidativ determinat de radiațiile ultraviolete este incriminat atât în apariția leziunilor benigne cât și a celor maligne melanocitare. Expunerea intermitentă, precum și timpul de expunere, sunt variabile ce influențează în mod negativ repararea ADN-ului. De altfel, melanocitele prezintă o oarecare rezistență la apoptoza indusă de radiații și astfel, pot păstra mutații apărute consecutiv expunerii prelungite. Pe lângă expunerea solară și culoarea pielii, diverse mutații genetice au fost studiate și incriminate în apariția acestor leziuni. Ele se pot clasifica în modificări ale alelelor, alterări ale genelor supresoare tumorale, alterări ale protooncogenelor, instabilitate microsatelită sau activitatea telomerazelor [23].

Diagnosticul clinic și histopatologic al nevilor displazici

Aspectele clinice caracteristice nevilor displazici urmaresc criteriile ABCDE folosite și în diagnosticarea melanomului. Nevul atipic sau displazic este un nev dobândit, apărut în perioada pubertății, dinamic, care își schimbă aspectul pe durata vieții. Apare mai frecvent pe torace, mai ales toracele posterior, dar și pe cap și membre superioare, zone expuse cu predilecție la soare. Cu toate acestea, mulți nevi, mai ales cei apăruiți la vârste fragede, au fost descriși și în arii protejate de radiațiile ultraviolete precum regiunea mamară, fesieră sau, rareori, iris. [23, 26, 28-31].

Clinic, nevul este considerat o leziune pigmentată cu dimensiuni mai mari de 5 mm, asimetric, cu margini neregulate care se pierd în pielea adiacentă, sub formă de „hartă

geografică” [29]. Central, de cele mai multe ori există o papulă înconjurată de un inel pigmentat, care se descrie clasic sub aspectul de „ou-ochi” [25]. Existența componentei plane este obligatorie, chiar dacă componenta papuloasă, ușor elevată, poate să nu existe sau să nu se observe [29]. În jurul leziunii poate apărea un lizereu eritematos, consecință a infiltratului inflamator confirmat histopatologic. Culoarea este variabilă, de la roz până la brun negricios, în funcție de culoarea pielii.

Histopatologic, criteriile de diagnostic ale nevilor displazici reprezintă încă subiect de discuție. Principalele aspecte care trebuie urmărite sunt modificările arhitecturale și atipiile citologice. Organizația Mondială a Sănătății împarte criteriile de diagnostic în criterii majore și minore; cele majore (obligatorii) presupun proliferarea basilară melanocitară atipică ce se extinde mai mult de trei papile epidermice față de componenta dermică și organizarea proliferării într-un pattern lentiginos sau epitelioid, pe când criteriile minore includ fibroza lamelară sau concentrică eozinofilă, neovascularizația, infiltratul inflamator limfoplasmocitar perivascular superficial și fuziunea rete retis.

Aspecte imunohistochimice în nevii displazici

Aspectele leziunilor melanocitare au ridicat frecvent probleme de diagnostic pe preparatele uzuale de hematoxin-eozină. Mai mulți markeri au fost testați și apoi folosiți în vederea diferențierii acestor proliferări de alte tumori cu origine diversă dar și pentru a diferenția diferite leziuni melanocitare ambigue. Panelul imunohistochimic pentru diferențierea leziunilor melanocitare benigne de cele maligne este, în principiu, stabilit, și include în primul rând un marker de proliferare celulară (Ki-67) alături de markeri specifici melanocitari (S-100, HMB45, Melan A). În schimb, diagnosticul diferențial între un nev displazic și un melanom nu este încă clarificat din punct de vedere imunohistochimic. În aceste cazuri, Ki-67 rămâne markerul de bază în aprecierea ratei de proliferare celulară. Cu toate acestea, atât markerii clasici cât și anticorpi nou descoperiți sunt frecvent folosiți cu scopul de a diferenția concret aceste leziuni.

Unul din cei mai vechi și folosiți markeri în leziunile melanocitare, cu sensibilitate mare dar non-specific, este *proteina S-100* [32]. Folosirea acestui marker este limitată ca urmare a faptului că acesta nu face diferența între nevii comuni, nevii displazici și melanom.

HMB45 este un anticorp monoclonal care reacționează față de formele glicozilate ale proteinei Pmel17/gp100. Este intens folosit în diagnosticarea proliferărilor melanocitare cutanate, pozitivând melanocitele active și imature [33] dar și melanoamele de țesuturi moi (sarcomul cu celulă clară) sau angioliipoamele.

Melan A (A103 sau MART1) este un antigen component din membrana premelanozomilor [34] de pe gena MLANA și este folosit în recunoașterea diferențierii melanocitare [35, 36]. Acesta este recunoscut de limfocitele T citotoxice de unde și denumirea de MART 1 [37, 38]. Este considerat un marker specific pentru diferențierea melanocitară, singurele patologii care fac excepție de la acest lucru fiind melanomul desmoplazic și cel cu celule fuziforme [39, 40].

BCL2 este o proteină cu rol în inhibarea apoptozei și care se exprimă în limfocitele T și mai puțin în limfocitele B activate [41], se asociază cu MiTF [42] și apare atât în limfoamele B, unde a și fost prima dată descrisă, cât și în alte patologii tumorale maligne precum carcinoamele de prostată, colonice, mamare, carcinoamele scuamoase de plămân, neuroblastome și în tumorile melanocitare benigne și maligne [43].

P53 este o fosfoproteină existentă în celulele gazde, codificată de TP53 După cum s-a demonstrat în literatura de specialitate, există două forme de p53 apărute în tumorigeneza - forma mutantă și forma „wild-type” (sălbatică), acesta din urmă fiind preponderentă în melanoamele maligne [44-46]. Expresia acestora a fost mult studiată însă multiple studii raportează date diferite, unele susținând că p53 apare târziu în evoluția melanomului, exprimându-se mai intens în melanomul metastazant, pe când studii mai recente arată o expresie p53 pozitivă inclusiv în nevii benigni sau leziunile atipice melanocitare [47,48]. Totodată, s-au descris mai multe tipuri de expresie imunohistochimică, chiar dacă proteina este una nucleară, în unele cazuri observându-se și o pozitivare intracitoplasmatică sau mixtă, în funcție de tipul de modificări apărute. [49-52].

Cyclin D1 este o proteină cu rol în ciclul celular ce pare a se corela pozitiv, după unele studii, cu gradul atipiilor cito-nucleare, exprimându-se zonal, la joncțiunea dermo-epidermică în cadrul nevilor displazici [53].

Ki-67 (MIB1) reprezintă unul din cei mai utilizați markeri ai proliferării celulare, utilizat în diagnosticul diferențial al tumorilor melanocitare benigne și maligne, în principiu în diferențierea melanomului în fază incipientă de nevii displazici sau nevii Spitz cu aspecte displazice.

Receptorii estrogenici sunt proteine nucleare activate de hormoni estrogenici care apar și în structurile tegumentului, unii autori demonstrând expresia receptorilor beta în tumorile melanocitare benigne și maligne, ambele tipuri de patologii fiind pozitive pentru subtipul beta dar nu și pentru receptorul estrogenic alpha [54, 55].

Aspecte de microscopie electronica

Melanozomii sunt organite specifice, înrudite cu lizozomii, care au rol în sinteza, stocarea și transportul melaninei [56]. În ceea ce privesc nevii atipici, studiile de microscopie electronică efectuate au descris multiple variante de melanozomi anormali, aberanți, uneori macromelanozomi, precum și o creștere a numărului acestora și a melanozomilor normo-structurali în comparație cu nevii melanocitari comuni [57-60]. Astfel, Takahashi a descris patru subtipuri de melanozomi aberanți: tipul 1 – melanozomi elipsoidali, cu conținut lamelar sau fibrilar, asemănător cu melanozomii normali, tipul 2 – cu structură sferică, incomplet lamelari, cu melanină dispusă dezorganizat, tipul 3 – sferici, cu conținut microgranular sau microvezicular, cu melanină ce depășește structurile vacuolare, și tipul 4 – sferici vacuolari, cu material amorf proteinaceu și rare focare de melanină; tipurile 2, 3 și 4 descriindu-se și în melanomul superficial și în cel nodular, dar nu în nevii comuni. Nakatani și co, pe de altă parte, au descris niște structuri melanozomiale gigante sau macroglobule de melanină prezente în celulele nevice și în keratinocitele din nevii displazici denumite macromelanozomi. Aceștia au dimensiuni de 1-2 μm , sunt sferici, au membrana înconjurătoare greu vizibilă, obscură datorită depozitelor de melanină, centru conține un material amorf electronodens și microvezicule electrono-transparente, iar cortexul este format din granule de dimensiuni și densități diferite [59]. Totodată, același Nakatani a descris și complexe melanocitare formate din melanozomi cu vezicule electronotransparente, cu dimensiuni comparabile cu macromelanozomii.

Diagnostic diferential si management terapeutic

Principalul diagnostic diferențial al nevilor displazici se realizează cu melanomul in situ și melanomul minim invaziv, în special în cazul nevilor atipici cu displazie severă. Totodată, nevul displazic trebuie diferențiat de lentigo malign, lentigo solar, keratoza seboreică, hematomul traumatic, dermatofibromul sau carcinomul bazocelular pigmentat [23]. Dintre proliferările melanocitare, nevul cu celule fuziforme, nevul Piepkorn, nevul congenital pot prezenta aspecte de displazie, mai ales în perioada copilăriei, a pubertății sau în sarcina, nevul Reed, nevul Spitz, nevul cu halou și nevii lentiginoși pot ridica probleme de diagnostic diferențial cu nevii displazici [61, 62].

Per total, riscul de a dezvolta un melanomul este considerat de aproximativ 10 ori mai mare la pacienții cu nevi displazici sporadici [26], risc ce variază în funcție de antecedentele personale sau heredo-colaterale ale individului, putând ajunge la un risc cumulativ de 49% pentru pacienții cu sindrom familial al nevilor displazici cu vârste între 10 și 50 ani, sau la un

risc de 82% pentru pacienții din decada a 8 a de viață diagnosticați cu același sindrom [25]. Nevii atipici cu displazie moderată pot progresa spre melanom ca urmare a diverselor mutații dovedite în literatura de specialitate, astfel că managementul se bazează pe excizia chirurgicală cu margini de rezecție libere, cel mai frecvent de 2 mm. Nevii cu displazie severă trebuie tratați ca precursori ai melanomului, iar dificultatea de a îi diferenția de o patologie malignă incipientă impune o conduită terapeutică cu excizia chirurgicală a tumorii cu margini de rezecție de cel puțin 5 mm.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Noțiuni introductive și motivația temei alese

Nevii displazici reprezintă, în continuare, o patologie controversată. Încă de la descrierea lor de către Clark și colaboratorii, în 1978 [26], au existat numeroase discrepante privind criteriile de diagnostic, evoluția și legătura lor de ansamblu cu melanomul malign [12,61]. În plus, de la ipoteza lansată de David Elder [25,63], cum că și nevii displazici sporadici reprezintă precursori ai melanomului malign, numeroase studii s-au concentrat în a defini această leziune și a clarifica criteriile de diagnostic, prognosticul și managementul terapeutic. Barnhill susține că nevii displazici reprezintă „un continuum a anormalităților morfologice reprezentate de nevii dobândiți <tipici> pe de o parte, și melanomul, pe de altă parte”, subliniind faptul că majoritatea datelor apărute în literatura de specialitate din ultimii douazeci de ani susțin, dar nu dovedesc clar, stadiul intermediar al nevilor displazici între nevii comuni și melanom [12]. Ackerman, pe de altă parte, se opune acestor considerente, afirmând despre nevil displazic că face parte din categoria nevilor melanocitari, fără a avea caractere speciale [61, 63].

Discrepanțele privind riscul dezvoltării melanomului și rolul de precursor malign al acestei entități rămâne în dezbatere continuă. Nici din punct de vedere al terminologiei, lucrurile nu sunt total clarificate. În urma consensului Institutului Național al Sănătății din SUA din 1992, s-a decis ca denumirea folosită să fie cea de <nev atipic> sau <nev cu dezordini arhitecturale și atipii citologice>, denumiri ce nu au fost totalmente abordate și acceptate, mulți clinicieni și anatomopatologi folosind în continuare termenul de „nev displazic”.

Studiile moleculare și imunohistochimice în vederea diferențierii nevilor displazici de melanom și de nevii comuni sunt în continuă expansiune. Până în momentul actual s-a dovedit existența clonalității, ceea ce apropie nevii displazici de nevii comuni. De altfel, similitudini privind moleculele implicate în apoptoză, în ciclul celular sau în reglarea celulară, par a susține ipoteza că nevii displazici sunt mai degrabă înrudiți cu nevii comuni decât cu melanomul.

Tocmai acest amalgam de dispute și controverse privind această entitate, neclaritățile și neconcordanțele în ceea ce privește încadrarea, evoluția, fiziopatogenia, aspectele morfologice și imunohistochimice sau tratamentul, m-au determinat să studiez mai îndeaproape această patologie. Studiul de față se axează pe aprofundarea noțiunilor clinice, morfologice, imunohistochimice, cu precăderea markeri imunohistochimici uzuali, și de microscopie electronică, cu scopul de a elabora un tablou cât mai corect și complet al acestor leziuni, de a aduce un ajutor în înțelegerea patogeniei, fiziologiei, morfologiei și a facilita diagnosticarea corectă a nevilor atipici. O data cu acesta, speram să venim în ajutor dermatologilor și a anatomopatologilor în vederea diagnosticării corecte și a tratamentului adecvat pentru această patologie.

Scopul si obiectivele generale ale cercetarii

Prezenta lucrare are ca și scop aprofundarea entității denumite „nev atipic” prin studierea caracterelor clinice, morfologice, imunohistochimice și de microscopie electronică, în vederea unei mai bune înțelegeri a fiziopatologiei și a simplificării diagnosticării ei.

Obiectivele studiului cuprind:

1. Analiza caracteristicilor generale, demografice și clinice a nevilor atipici și compararea lor cu nevii nevocelulari comuni,
2. Analiza și raportarea caracterelor de macroscopie și histologie, compararea acestora cu lotul martor compus din nevi nevocelulari comuni, precum și găsirea unor corelații a acestora în vederea înțelegerii mai clare a fenomenelor apărute,
3. Studierea unor markeri imunohistochimici uzuali, comuni în laboaratoarele de specialitate, dar noi pentru patologia în cauza,
4. Corelarea expresiilor imunohistochimice și a caracterelor histologice,
5. Studierea aspectelor nevilor displazici prin microscopie electronică.

Material și metode de cercetare

Studiul de față a fost realizat pe o perioadă de un an, între 2014- 2015 și a inclus un număr de 133 de leziuni diagnosticate ca fiind nevi displazici și 96 de leziuni diagnosticate ca fiind nevi nevocelulari comuni. Lotul de studiu propriu-zis, format din nevi atipici, a inclus 66 de pacienți iar lotul martor cuprinde un număr de 36 de pacienți.

Criteriile de includere a leziunilor în lotul-martor se suprapun criteriilor de diagnostic anatomo-patologice pentru nevi nevocelulari comuni. Nevii displazici sau atipici au fost incluși în studiu după confirmare anatomo-patologica pe piese formolizate, parafinate și colorate cu Hematoxilină-Eozină. S-au notat atât date priviind diagnosticul clinic de trimitere, localizarea, aspectele macroscopice și aspectele microscopice, dar și alte leziuni asociate care au fost observate adiacent.

Studiul morfologic s-a realizat în două direcții, atât pentru lotul de studiu format din nevi displazici, cât și pentru lotul-martor. Scopul acestor studii a fost de a caracteriza din punct de vedere clinic, macroscopic și microscopic leziunile discutate cât și pentru a compara caracteristicile rezultate.

În studiul de față au fost incluse 27 de cazuri de nevi displazici pentru care s-au realizat analize imunohistochimice. Ținta imunohistochimiei este detectarea antigenelor celulare sau tisulare prin aplicarea unor anticorpi marcați care pot fi vizualizați prin microscopie optică.

Anticorp	Clona	Dilutie	Distribuitor
Melan A/MART1	M2-7C10+ M2 - 9E3	1:100 = 2/198	BIOCARE
HMB-45	monoclonal	RTU (ready to use)	BIOCARE
Bcl2	monoclonal	1:100= 2/198	BIOCARE
Cyclin D1	monoclonal SP4	1:50 = 4/196	BIOCARE
P53	EP9 monoclonal	1:50 = 2/198	BIOCARE
Ki-67	monoclonal	1: 100	BIOCARE
ER (receptor estrogen)	PPG5 monoclonal	RTU	GENOVA

Prin microscopie electronică au fost analizate două cazuri de nevi displazici și un fragment de tegument normal în cadrul Institutului de Cercetare- Dezvoltare Victor Babeș

București, prin proiectul CERO- Profil de Carieră: Cercetător Român, POSDRU/159/1.5/S/135760. Analiza structurii și ultrastructurii țesutului a fost efectuată conform procedurii standard în laboratorul de Patologie Ultrastructurală.

Rezultate și discuții

Studiul clinic și epidemiologic al nevilor nevocelulari comuni

Lotul martor inclus în studiu este alcătuit din 96 de nevi nevocelulari comuni ce au fost excizați de la 36 de pacienți în cadrul Secției de Chirurgie Plastică și Reparatrice a Spitalului Universitar de Urgență București și trimiși în vederera prelucrării și diagnosticării microscopice în cadrul Departamentului de Anatomie Patologică al aceluiași spital în perioada 16. 01. 2014 – 16. 02. 2015. Dintre cei 36 de pacienți, 9 sunt de sex masculin (reprezentând 25% din cazuri) și 27 de sex feminin (75%), cu un raport de 1:3.

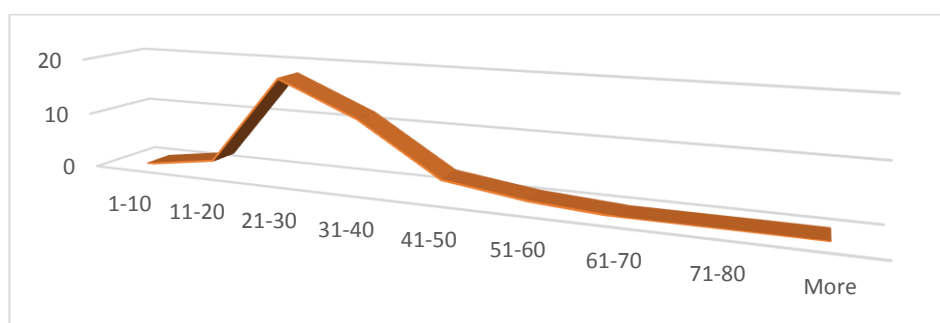


Fig. 11 : Distribuția vârstei medii la pacienții cu nevi nevocelulari comuni

Vârsta medie a pacienților proveniți din mediul rural este de 31,8 +/- 5,44 iar cea a celor din mediul urban 30, 32 +/- 9,09 ani. Dimensiunea medie a nevilor a fost de 5, 95 +/- 3,08 mm. Vârsta medie în funcție de localizarea leziunilor, precum și dimensiunile medii în funcție de localizare se regăsesc în tabelul 1.

Localizare	Vârsta medie +/- Deviația standard	Dimensiuni medii +/- Deviația standard
Extremitate cefalică (cap, gât, scalp)	27,53 +/- 8,21	4,93+/-2,05
Torace posterior	30,16 +/- 9,09	6,09 +/-3,26
Torace anterior (excluzând zona mamară)	27,5+/- 6,65	7,83 +/- 2,48
Abdomen	34,4 +/- 13,8	5,2 +/- 1,39

Membre superioare	28,3 +/- 6,65	4,25 +/- 2,21
Membre inferioare (excluzând localizarea acrală)	26,6 +/- 11,01	8,75 +/- 5,5
Localizări speciale (acral, genital, zonă mamară)	29,85 +/- 6,51	6,06 +/- 3,47

Tabel 1: Vârstele medii ale pacienților și dimensiunile medii ale nevilor nevocelulari comuni în funcție de localizări

Din totalul de 96 de nevi comuni, 6 sunt joncțional, 30 intradermici și 60 compuși

Utilizând testul T-student nu s-a observat nici o diferență semnificativă statistic între majoritatea vârstelor pacienților în funcție de localizare, cu excepția diferențelor semnificative dintre abdomen și membrele superioare precum și între abdomen și localizări speciale cu un $p=0.04$. În ceea ce privește diferențele dintre dimensiunile nevilor raportate la localizări, observăm că există diferențe între dimensiunile nevilor localizați la nivelul extremității cefalică și torace posterior ($p=0.05$), între extremitatea cefalică și toracele anterior ($p=0.01$), precum și între nevi localizați la nivelul toracelui anterior și abdomen ($p=0.02$) sau între torace anterior și membre superioare ($p=0.02$)

Studiul clinic și epidemiologic al nevilor displazici

Lotul de studiu este format din 144 de nevi displazici prezenți la un număr total de 66 de pacienți internați și diagnosticați în aceeași secție din cadrul Spitalului Universitar de Urgență București. Dintre aceștia, 30,30% sunt bărbați și 69,70% sunt femei, raportul femei:bărbați fiind 2.3:1. Vârsta medie a pacienților este de 32,81 +/- 10,81 de ani (Fig. 24), iar dimensiunea medie a nevilor displazici din cadrul studiului este de 5,75 +/- 2,66 de mm (Fig. 26).

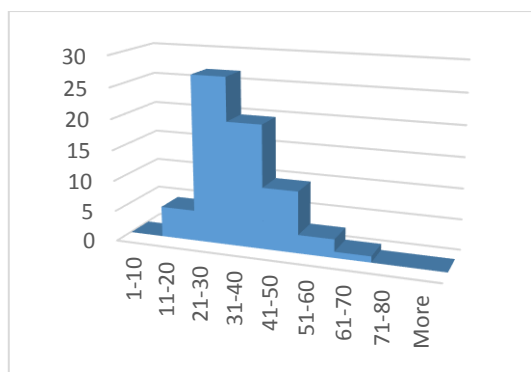


Fig. 24: Distribuția pe grupe de vârstă a pacienților cu nevi displazici



Fig. 26: Nev displazic – aspect macroscopic

Localizarea de elecție este reprezentată de toracele posterior (41%), urmând apoi regiunile speciale (22%) și abdomenul (14%) (Fig. 25).

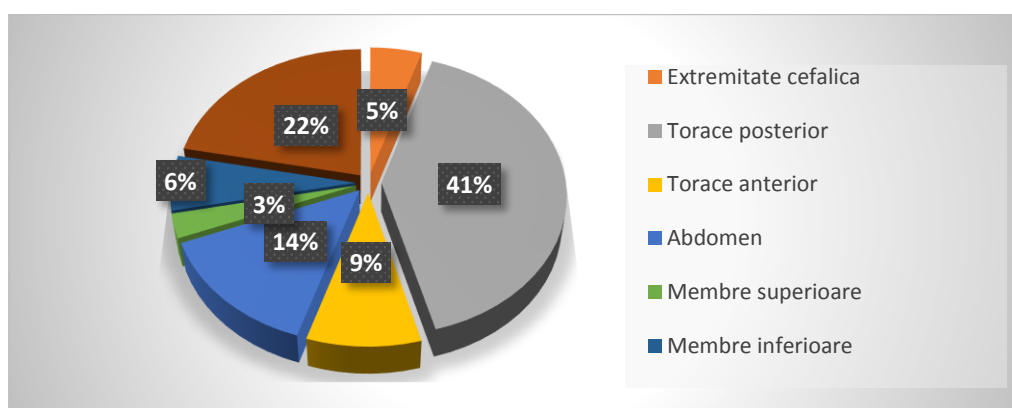


Fig. 25: Distribuția nevilor displazici

Nevii displazici au fost clasificați în nevi displazici compuși (113 cazuri – 78,47%) și nevi displazici joncțional (31 de cazuri- 21,53%), neexistând varianta intradermică.

Vârsta medie a pacienților ce prezintă nevi displazici precum și dimensiunile medii ale nevilor cu diferite localizări se regăsesc în tabelul 10.

Localizare	Vârsta medie +/- Deviația standard	Dimensiuni medii +/- Deviația standard
Extremitate cefalică (cap, gât, scalp)	23+/- 9,38	4,42+/- 2,29
Torace posterior	30,29 +/- 6,52	5,55 +/- 2,45
Torace anterior (excluzând zona mamară)	32,72 +/- 9,72	5,53 +/- 3,07
Abdomen	33 +/- 9,91	6,65 +/- 2,32
Membre superioare	32 +/- 13,61	5,5 +/- 2,08
Membre inferioare (excluzând localizarea acrală)	42,66 +/- 15,52	4,14 +/- 1,95
Localizări speciale (acral, genital, zona mamară)	32,5 +/- 12,5	6,29 +/- 3,21

Tabel 10: Vârstele și dimensiunile medii ale pacienților cu nevi displazici în funcție de localizare

Vârsta pacienților diagnosticați cu nevi displazici pe extremitatea cefalică a variat semnificativ de restul localizărilor, cu excepția formațiunilor nevice de pe membrele superioare.

Totodată, vârsta pacienților cu leziuni localizate pe membrele inferioare a fost semnificativ diferită de restul cazurilor. Diferențe s-au regăsit și în cazurile cu nevi localizați pe toracele posterior versus abdomen (Tabel 11).

Lot studiu	Extremitate cefalică	Torace posterior	Torace anterior	Abdomen	Membre superioare	Membre inferioare	Localizări speciale
Extremitate cefalică		P= 0.03	P= 0.03	P=0.00	P=0.15	P=0.00	P=0.02
Torace posterior			P=0.34	P=0.05	P=0.41	P= 0.00	P = 0.21
Torace anterior				P =0.25	P= 0.47	P = 0.00	P = 0.42
Abdomen					P = 0.40	P = 0.01	P = 0.29
Membre superioare						P = 0.04	P = 0.48
Membre inferioare							P = 0.00
Localizări speciale							

Tabel 11: Semnificația statistică a diferențelor privind vârstele pacienților cu nevi displazici în funcție de localizări (Test T-Student)

Comparând dimensiunile nevilor displazici în funcție de localizare au fost găsite diferențe semnificative statistic în cazurile nevilor localizați pe extremitatea cefalică versus abdomen, membre inferioare și localizări speciale, precum și în cazurile nevilor localizați pe toracele posterior în comparație cu cei localizați pe abdomen și membre inferioare. Dimensiunile leziunilor de pe abdomen sunt semnificativ statistic diferite de cele de pe membrele inferioare. Același lucru a fost observat și în cazul leziunilor localizate pe membrele inferioare în comparație cu nevi cu localizări speciale (Tabel 12).

Lot studiu	Extremitate cefalică	Torace posterior	Torace anterior	Abdomen	Membre superioare	Membre inferioare	Localizări speciale
Extremitate cefalică		P= 0.13	P= 0.18	P=0.02	P=0.22	P=0.4	P=0.04

Torace posterior			P=0.49	P=0.03	P=0.48	P= 0.05	P = 0.13
Torace anterior				P =0.13	P= 0.48	P = 0.11	P = 0.23
Abdomen					P = 0.18	P = 0.00	P = 0.32
Membre superioare						P = 0.16	P = 0.26
Membre inferioare							P = 0.01
Localizări speciale							

Tabel 12: Semnificația statistică a diferențelor privind dimensiunile nevilor displazici în funcție de localizări (Test T-Student)

Analiza comparativă a celor două loturi

În ceea ce privește compararea lotului martor cu lotul de studiu, nu există diferențe semnificative statistic între vârstele pacienților (Test T-Student, $p=0,24$), și nici între vârstele pacienților de sex feminin ($p> 0.05$) sau de sex masculin ($p = 0,23$) (Fig. 30).

Nici în ceea ce privește vârsta pacienților în funcție de localizare nu s-au înregistrat diferențe semnificative statistic.

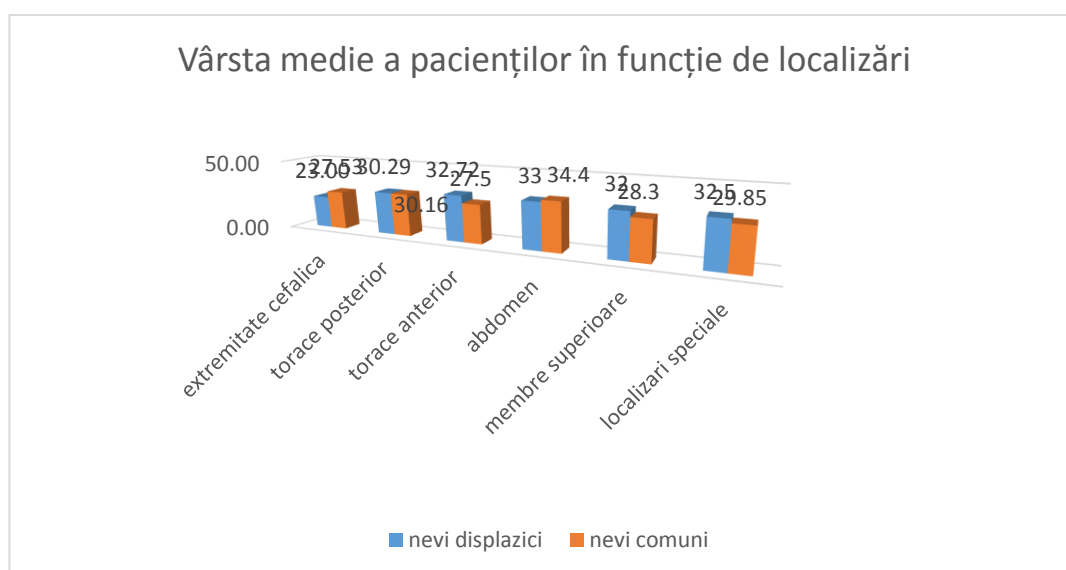


Fig. 31: Vârsta medie a pacienților din cele două loturi în funcție de localizările anatomice

Comparând vârstele medii a nevilor joncționali din cele două loturi (lotul de control – 26,16 de ani, lotul de studiu – 35,29 de ani) formate, se poate observa un $p = 0.01$, fapt ce certifică semnificația diferențelor observate.

Pentru nevii localizați pe toracele posterior, dimensiunea nevilor comuni în comparație cu cea a nevilor displazici este, în acest caz, semnificativă statistic (6,14 pentru nevii displazici versus 8,6 pentru nevii comuni, cu un $p=0,05$, test T-student). Totodată, dimensiunea leziunilor de pe abdomen ce alcătuiesc cele două loturi diferă semnificativ la pacienții de sex feminin ($p=0,01$, test T-student). În cazul neviilor de pe *membrele superioare*, toate leziunile din ambele loturi au fost diagnosticate la femei, existând o diferență semnificativă între vârstele celor două loturi ($p=0,04$). Nevii de pe *membrele inferioare* nu au variat în ceea ce privește vârsta pacienților de sex feminin, în schimb, dimensiunile nevilor comuni au variat semnificativ statistic de nevii displazici ($p=0,05$).

Studiul morfologic al nevilor displazici

Nevii displazici au fost împărțiți, din punct de vedere histologic, în nevi displazici compuși (113 cazuri – 78,47%) (Fig. 36) și nevi displazici joncționali (31 de cazuri – 21,53%) (Fig 37). Dimensiunea medie a tuturor nevilor din cadrul studiului de față este de 5,75 +/- 2,66 mm, cu o medie pentru nevii joncționali de 4,19 +/- 2,08 mm și pentru cei compuși de 6, 18 +/- 2,65 mm, diferențe semnificative statistic (Test t-student, $p<0.001$).

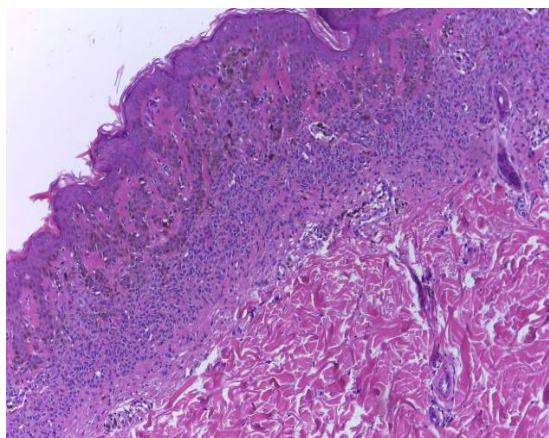


Fig. 36: Nev displazic compus, HE, 200x

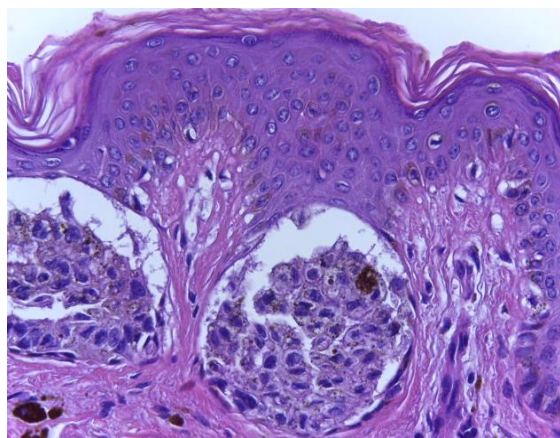


Fig. 37: Nev displazic joncțional, HE, 400x

Nu s-a dovedit, per ansamblu, o corelație semnificativă între vârstele pacienților și dimensiunile lezionale ($p>0.05$), în schimb, vârstele pacienților de sex feminin s-au corelat slab dar semnificativ statistic cu dimensiunile nevilor displazici diagnosticați (Coeficient Pearson, $r(99)= 0.25$, $p=0.008$, Fig. 38).

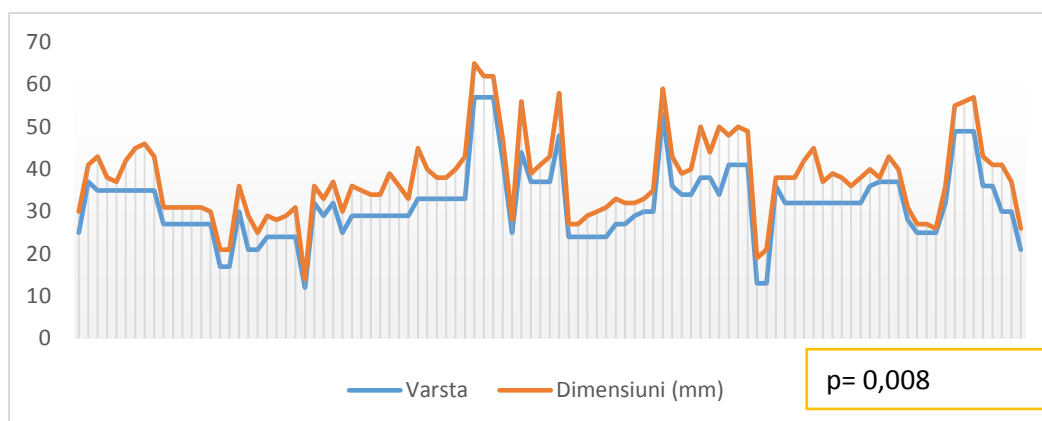


Fig. 38: Corelație semnificativă statistic între vârstele pacienților de sex feminin și dimensiunile nevilor displazici

Cea mai frecventă localizare a nevilor displazici a fost toracele posterior, cu o frecvență de 41%, urmată de localizările speciale (22%) și abdomen (14%). Contrar datelor din literatura de specialitate, membrele superioare și inferioare au prezentat cele mai puține leziuni (6% pentru membrele inferioare și 3% pentru brațe), împreună cu extremitatea cefalică (5%), una dintre localizările citate ca fiind relativ frecvente pentru această patologie. Aplicând testul Chi-pătrat pentru a vedea dacă există o diferență semnificativă între cele două categorii în ceea ce privește localizarea, am obținut un $p=0.07$, dovedind că nu există suficiente date care să susțină o astfel de teorie. Realizând același test pe fiecare localizare în parte, am obținut un $p=0.01$ pentru nevi localizați pe membrele inferioare, aceasta fiind singura localizare pentru care se poate susține că există o diferență semnificativă între datele obținute și cele așteptate.

În ceea ce privește distribuția nevilor în funcție de tipul histologic, observăm că nevi displazici compuși se dispun cu precădere la nivelul toracelui posterior, a zonelor speciale și pe abdomen, respectând distribuția calculată per ansamblu pentru această patologie (Fig. 40). Și în cazul de față există o excepție, acesta fiind reprezentată tot de nevi localizați pe membrele inferioare care au fost diagnosticați cu precădere ca fiind nevi displazici joncționali (3,5%).

Pentru a afla dacă există o diferență semnificativă între localizarile nevilor displazici ținând cont de tipul histologic, s-a aplicat, și în acest caz, testul Chi-pătrat, ce a arătat o diferență semnificativă între rezultatele studiului și cele așteptate ($p=0.03$), putând, astfel, concluziona că leziunile au localizări specifice în funcție de tipul histologic. Totodată, putem afirma, pe aceleași considerente, că nevi de pe membrele inferioare vor fi cu precădere joncționali ($p=0.01$).

Nevii atipici incluși în studiul de față au fost împărțiți, din punct de vedere al **displaziei**, în trei categorii: displazie ușoară (notată cu 1) (Fig. 41), displazie moderată (notată cu

indicativul 2) (Fig. 42) și displazie severă (notată cu indicativul 3) (Fig. 43), în funcție de caracteristicile citologice și arhitecturale întâlnite.

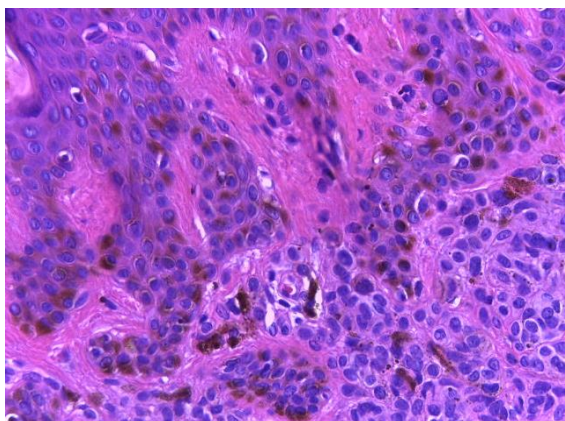


Fig. 41: Nev displazic compus cu displazie ușoară, HE, 400X

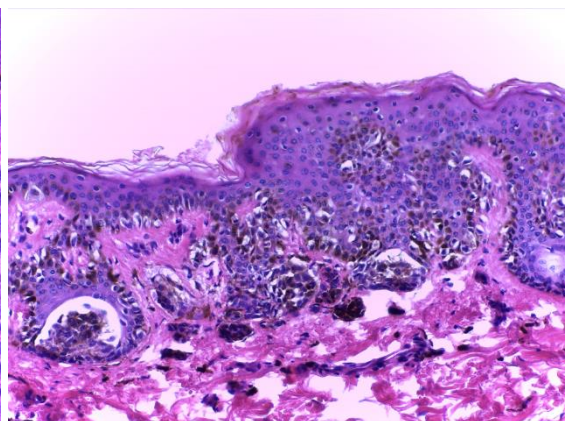


Fig. 43: Nev displazic jonțional cu displazie severă. HE, 200X

Diferențele observate între cele trei dimensiuni sunt relevante statistic atât pentru nevii cu displazie ușoară în comparație cu nevii cu displazie moderată ($p=0.02$, test T-Student), cât și pentru nevii cu displazie ușoară în comparație cu nevii cu displazie severă ($p = 0.01$, test T-Student). În schimb, între dimensiunile nevilor cu displazie de grad moderat și cei cu displazie de grad înalt, diferența nu este atât de semnificativă ($p=0.06$, test T-Student) (Fig. 47).

Corelând gradul displaziei cu dimensiunile leziunilor se observă o asocierie slabă între cele două categorii ($r_{(142)} = 0.26$, $p=0.001$, coeficient Pearson), observându-se o ușoară tendință de creștere a gradului displaziei o dată cu dimensiunile tumorale (Fig. 49).

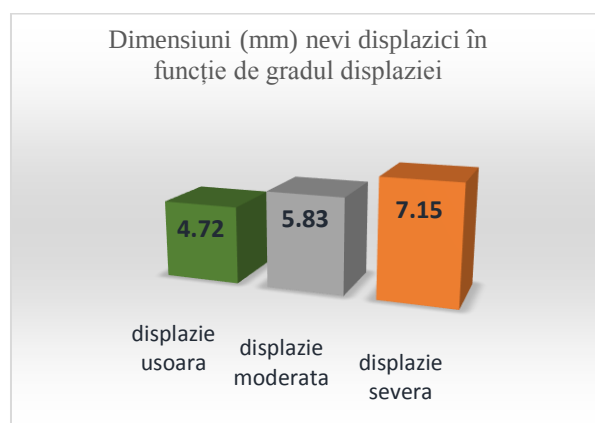


Fig. 47: Dimensiunile medii ale nevilor displazici în funcție de gradul displaziei

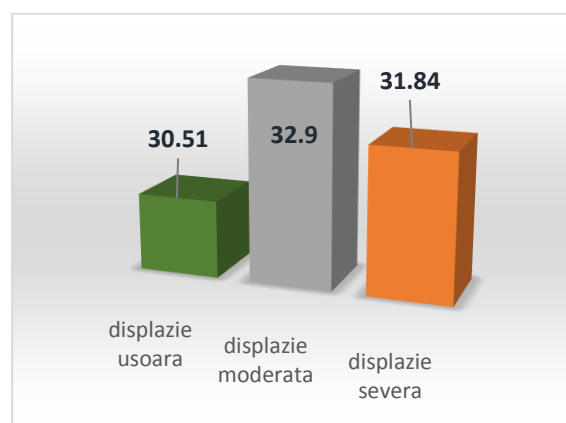


Fig. 50: Vârstele medii ale pacienților cu nevi displazici în funcție de gradul displaziei

Vârsta medie a pacienților diagnosticați cu nevi atipici cu displazie ușoară a fost de 30,51 +/- 7,52 ani, cei cu nevi cu displazie moderată au avut o vârstă medie de 32,90 +/- 11,17 ani, iar cei cu displazie severă 31,84 +/- 11,53 ani (Fig. 50).

Corelând vârstele pacienților cu gradul displaziei s-a dovedit că nu există nici o asocierie între cei doi parametrii (coeficientul Pearson, $p=0.5$), putând concluziona, astfel, că vârsta nu reprezintă un factor de influență asupra gradului de displazie a acestor leziuni.

O altă caracteristică a nevilor displazici studiată în lucrarea de față este **fibroza**. Acesta este frecvent împărțită în fibroză lamelară și fibroză concentrică, însă, în realitate, cele două forme apar frecvent intricate în cadrul aceleiași leziuni.

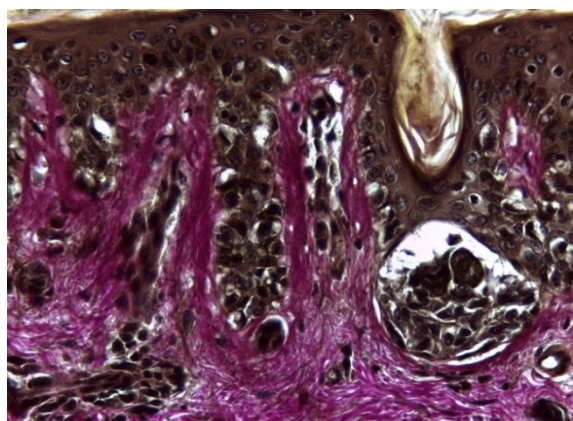


Fig. :Nev displazic cu fibroză marcantă, Van, Gieson, 400X

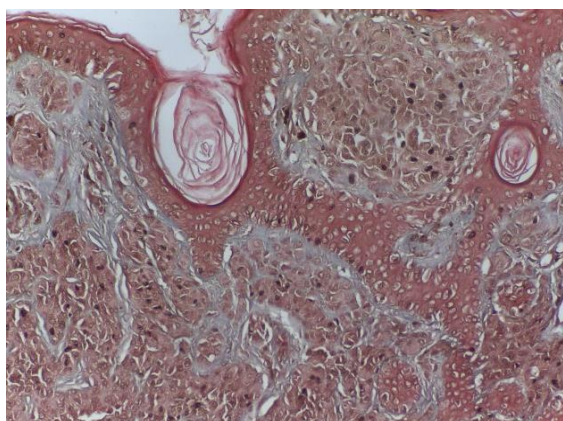


Fig. : Nev displazic compus cu fibroză moderată, Tricrom Masson, 200x

Astfel, am împărțit nevii în funcție de gradul de apariție al fibrozei, și nu de tipul acesteia, în nevi cu fibroză ușoară, moderată și severă, respectiv fără aspecte relevante de fibroză. Pentru o mai bună apreciere a fibrozei, am realizat colorații speciale (Van Gieson și Tricrom Masson) (Fig. 51, 52), pe lângă colorația uzuală Hemalaun-Eozină (Fig. 53).

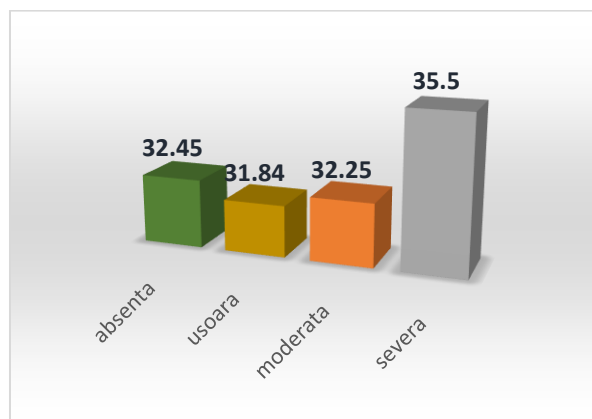


Fig. 56: Vârstele medii ale pacienților cu diferite grade

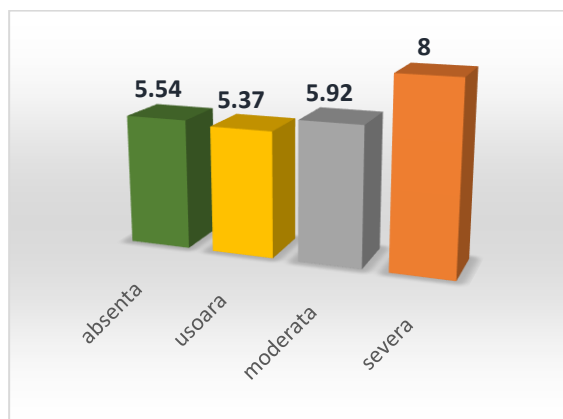


Fig. 60: Dimensiunile nevilor (mm) în funcție de de fibroză gradul de fibroză

Nu s-a demonstrat nici o diferență semnificativă a vârstelor între cele patru categorii de nevi, în funcție de gradul fibrozei ($p>0.05$ în toate cazurile, Test T-student).

Nu s-au dovedit diferențe semnificative între dimensiunile nevilor displazici pe categoriile formate ținând cont de gradul fibrozei ($p>0.05$, test T-student, în toate cazurile).

Totodată, nu s-a obținut o corelație semnificativă statistic între dimensiunile leziunilor și gradul fibrozei ($p=0.12$, coeficient Pearson).

Infiltratul inflamator, o altă caracteristică specifică nevilor displazici, a fost de asemenea studiat, iar nevii au fost caracterizați, în funcție de prezența infiltratului, asemănător celor de mai sus (indicativ 0- absența infiltratului, indicativ 1- infiltrat inflamator în cantitate redusă, indicativ 2 – infiltrat inflamator moderat, indicativ 3 – infiltrat inflamator în cantitate crescută) (Fig. 62, 63).

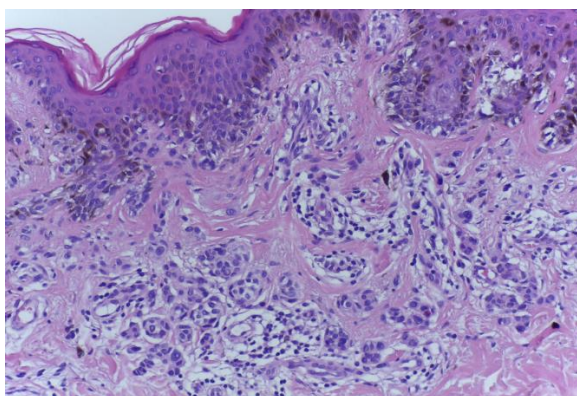


Fig. 63: Nev displazic cu infiltrat inflamator ușor-moderat, HE, 200X

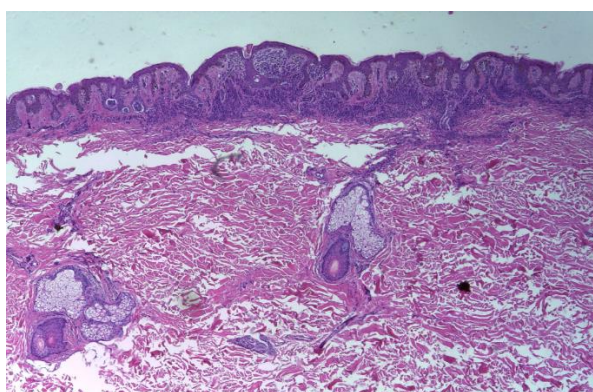


Fig. 62: Nev displazic cu infiltrat inflamator în cantitate crescută, HE, 200x

Se poate observa în acest caz o diferență semnificativă statistic între vârstele pacienților cu infiltrat inflamator în cantitate mult crescută în comparație cu restul categoriilor ($p < 0.05$, test T-Student); în schimb, pentru primele trei categorii diferențele nu sunt relevante statistic. În figura 67 putem observa tendința de distribuție a vârstelor în funcție de nivelul infiltratului inflamator în comparație cu vârstele tuturor pacienților, existând o diferență relevantă statistic pentru pacienții cu nevi prezentând infiltrat inflamator sever ($p=0.04$, test T-Student).

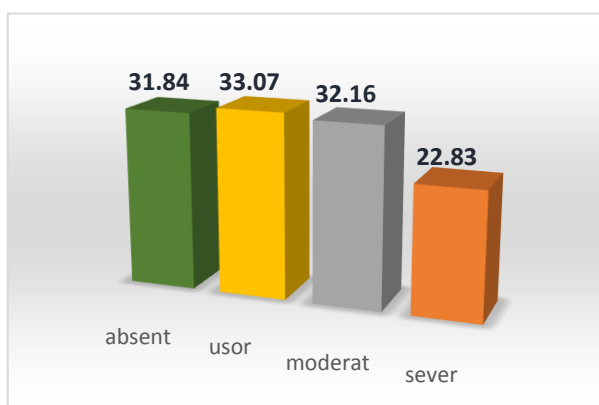


Fig. 66: Vârstele medii ale pacienților (ani) în funcție de gradul infiltratului inflamator

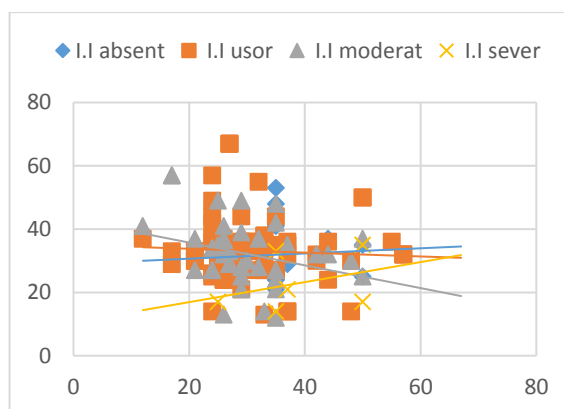


Fig. 67: Tendința de distribuție a vârstelor în funcție de nivelul infiltratului inflamator

Dimensiunea medie a nevilor fără infiltrate inflamatorii a fost de 5,73 +/- 2,82 mm, cei cu infiltrate minime au avut o dimensiune medie de 5,64 +/- 2,5 mm, nevii cu moderat infiltrat inflamator au fost de 6,09 +/- 2,97 mm, iar cei cu marcat infiltrat inflamator au avut o dimensiune medie de 4,83 +/- 1,83 mm (Fig.69). Diferențele dimensiunilor nevilor împărțiți pe categorii, nu sunt relevante statistic, cu un $p > 0.05$ după aplicarea testului T-Student.

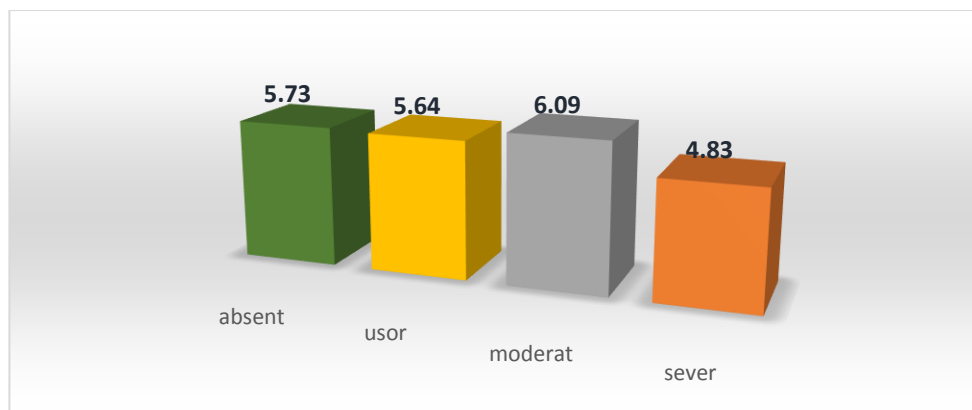


Fig. 69: Dimensiunile medii ale nevilor displazici în funcție de gradul infiltratului inflamator

Extensia pagetoidă se definește ca existența unei ascensiuni a celulelor nevice în o treime inferioară, până maxim, jumătatea inferioară a epidermului și reprezintă un semnal de alarmă în ceea ce privește riscul viitor de transformare malignă. Extensia pagetoidă în cazul nevilor displazici nu trebuie confundată cu extensia melanocitară observată în melanomul malign, însă mecanismul prin care apare este, cel mai probabil, aceleași. În comparație cu restul aspectelor studiate, în acest caz a fost urmărită doar existența sau absența extensiei. (Fig 72, 73).

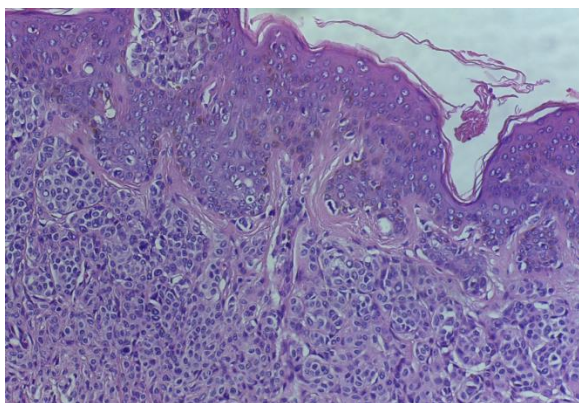


Fig. 72: Nev displazic compus cu extensie pagetoidă, HE, 200X

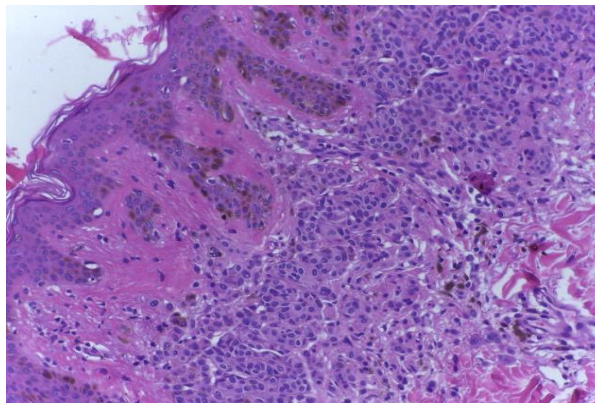


Fig. 73: Nev displazic compus fără aspecte de extensie pagetoidă, HE, 200X

Din totalul cazurilor studiate, 69 leziuni (48%) nu au prezentat aspecte de extensie pagetoidă, 75 (52%) prezentând extensie pagetoidă în grade ușoare. Dintre leziunile fără aspecte de ascensionare epidermală a melanocitelor, 71% (49 de nevi) au fost diagnosticați la

femei și 29% (20 de nevi) la bărbați. Nevii cu extensie pagetoidă au fost prezenți la 52 de femei (69,3%) iar restul la pacienții de sex masculin (30,7% - 23 de leziuni) (Fig. 74).

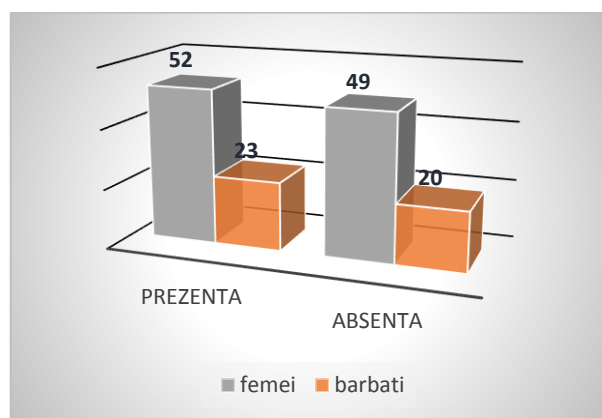


Fig. 74: Distribuția extensiei pagetoide pe sexe

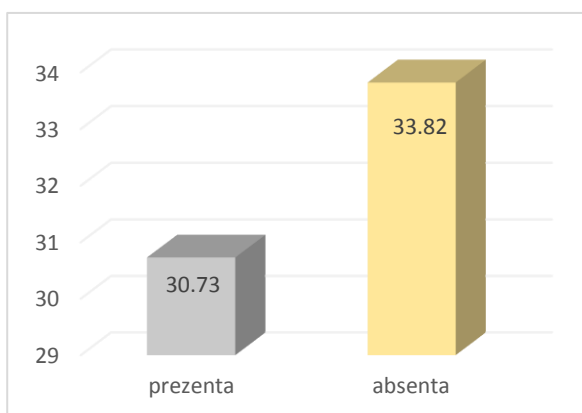


Fig. 75: Vârstele medii ale pacienților în funcție de extensia pagetoidă

Vârsta medie a pacienților cu leziuni fără extensie pagetoidă este de 33,82 +/- 11,25 de ani, iar pentru cei cu leziuni prezentând extensie vârsta medie este de 30,73 +/- 9,55 de ani (Fig. 75), diferite semnificativ statistic aplicând testul T-Student ($p=0.03$).

Diferențele semnificative între cele două grupuri sunt datorate diferențelor dintre vârstele pacienților de sex feminin ($p=0.04$, test T-Student), diferențele vârstelor bărbaților din cele două categorii nefiind semnificative statistic.

Corelând displazia cu fibroza, prin coeficientul Pearson - funcția Regression, observăm o corelație de putere moderată ($r(142)= 0.36$, $p<0.00$), putând astfel presupune că o data cu displazia crește de gradul fibrozei (Fig. 79).

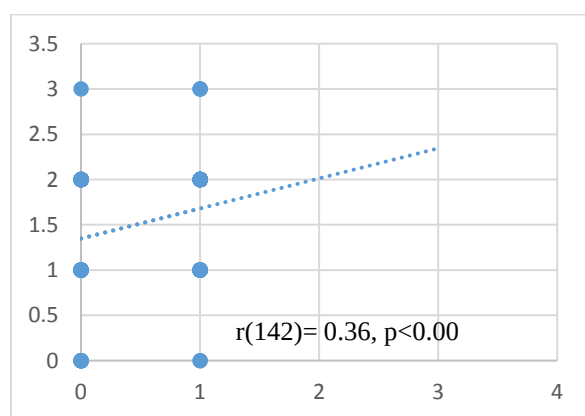


Fig. 79: Corelație între gradul displaziei și al fibrozei

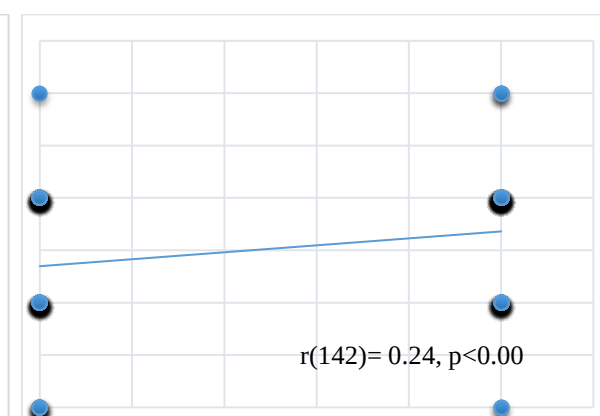


Fig. 80: Grad scăzut de corelație între extensia pagetoidă și fibroză

S-a dovedit totodată că displazia se corelează cu gradul infiltratului inflamator ($r(142)= 0.37$, $p<0.00$ – coeficient Pearson) și cu gradul extensiei pagetoide ($r(142)= 0.40$, $p<0.00$).

Altfel spus, cu cât nevul atipic prezintă aspecte de displazie mai severă, cu atât caracteristicile secundare, fibroza, infiltratul inflamator și extensia pagetoida sunt mai frecvent întâlnite și în grade mai mari. Pentru a înțelege mai bine aceste asocieri, am realizat și corelații între gradul fibrozei și a infiltratului inflamator, rezultând, și în acest caz, o legătură moderată între cele două caracteristici ($r(142)= 0.43, p<0.00$). În schimb, corelând gradul fibrozei cu extensia pagetoidă am obținut o corelație mai degrabă slabă ($r(142)= 0.24, p<0.00$) (Fig. 80), însă o asocierie importantă există între extensia pagetoidă și infiltratul inflamator ($r(142)= 0.42, p<0.00$) (Fig. 81).

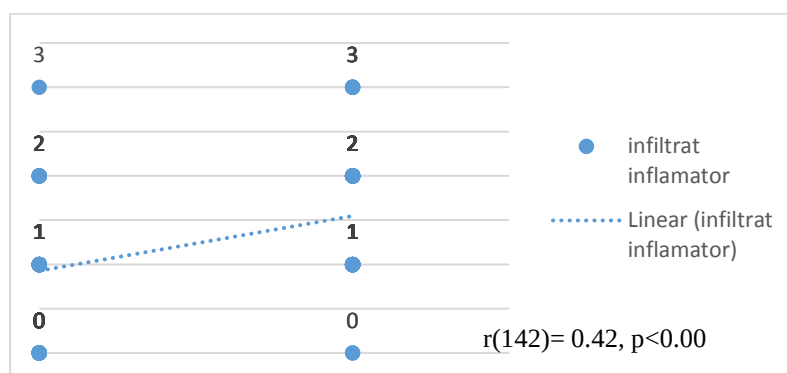


Fig. 81: Nivel moderat de corelație între extensia pagetoidă și cantitatea de infiltrat inflamator

Studiul HMB-45

Din totalitatea nevilor testați, un singur nev nu a fost relevant, leziunea fiind consumată și modificată artefactual ca urmare a tehnicii. În rest, o singură leziune nu a prezentat pozitivitate, 7 leziuni au prezentat pozitivitate slabă, 12 – pozitivitate moderată și 6 au fost intens pozitivi. HMB-45 a fost considerat pozitiv citoplasmatic și a fost observat mai ales în cuiburile nevocelulare displazice, pierzându-și din expresie o dată cu maturarea celulară din profunzime.

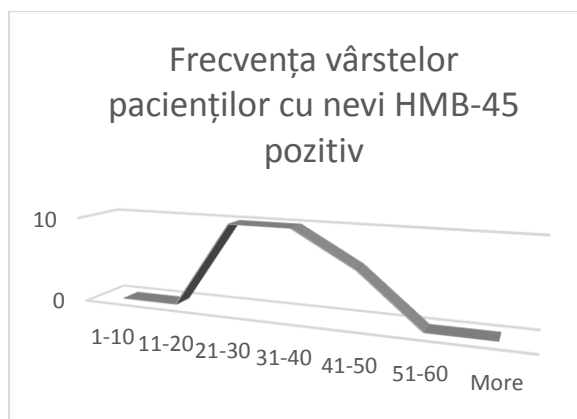


Fig. 83: Frecvența vârstelor pacienților cu nevi HMB-45 pozitivi

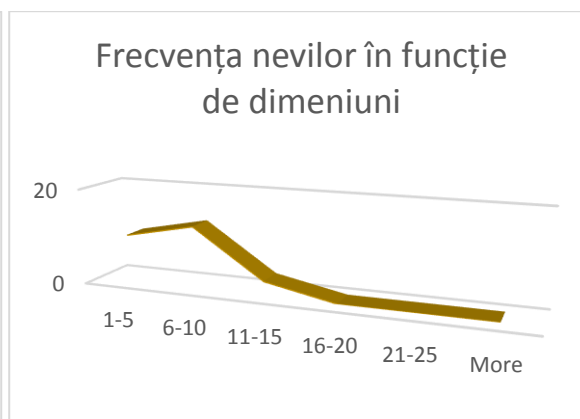


Fig. 84: Frecvența nevilor în funcție de dimensiuni

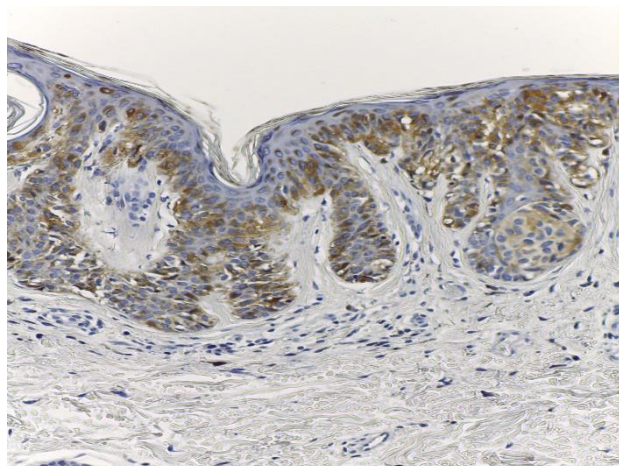


Fig. 85: Nev displazic compus, HMB45 slab pozitiv, 200X

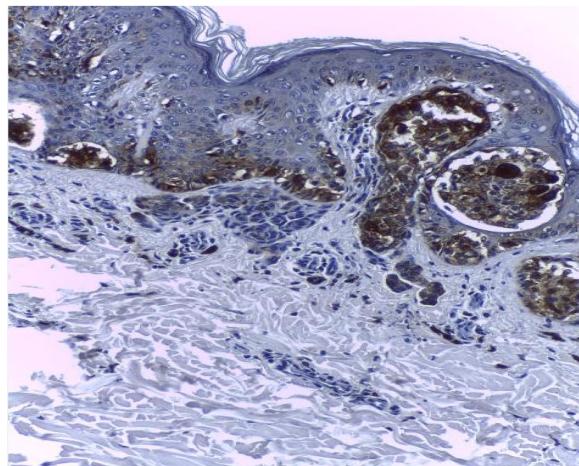


Fig. 87: Nev displazic compus cu expresie intensa HMB45, 200X

Comparativ cu vârsta tuturor pacienților cărora li s-au analizat imunhistochimic caracteristicile leziunilor displazice, vârsta pacienților a căror nevi au prezentat un raspuns slab la colorația HMB-45 a fost semnificativ statistic mai mică (test T-Student, $p < 0.05$). În schimb, dimensiunile nu au variat semnificativ.

Studiul Melan A

Marker-ul Melan A nu a putut fi evaluat în două cazuri din cele 27 datorită consumării leziunii, respectiv a artefactuării acesteia. Din leziunile restante, nouă au prezentat expresie moderată și restul pozitivitate intensă, fără a exista cazuri cu expresie slabă sau negativă (Fig. 88). De subliniat că în mai multe cazuri s-a putut observa o gradare a expresiei în funcție de localizarea cuiburilor celulare, dispunere asemănătoare cu cea observată în cadrul imunopozitivității HMB-45. Astfel, Melan A a fost mai intens în celulele displazice de la nivelul joncțiunii decât în celulele intradermice.

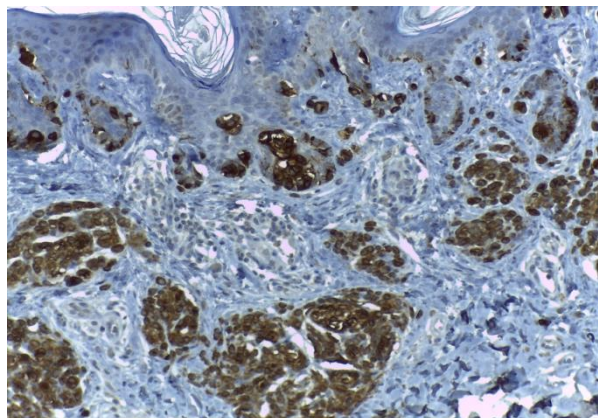


Fig. 91: Nev displazic compus cu expresie Melan A de intensitate moderata, 200X

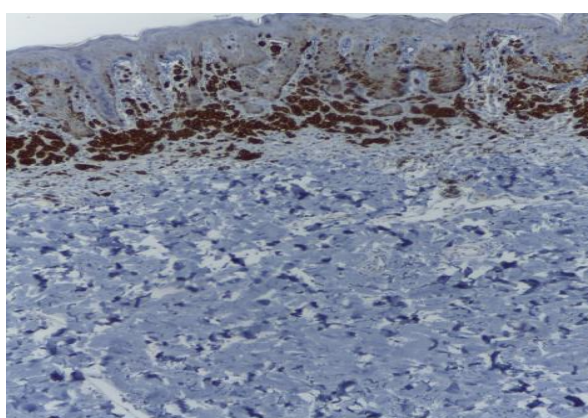


Fig. 92: Nev displazic compus cu expresie Melan A intensă, 100X

Vârsta medie a pacienților a fost de 33,08 +/- 1,63 de ani, iar dimensiunile medii au fost de 6,16 +/- 0,51 mm (Fig. 89, 90).

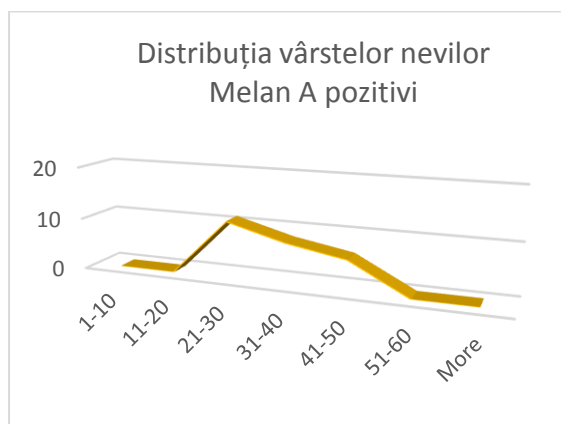


Fig 89: Distribuția vârstelor pentru leziunile Melan A pozitive

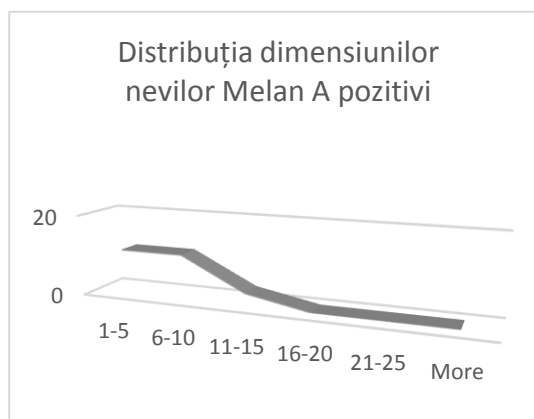


Fig. 90: Distribuția dimensiunilor nevilor Melan A pozitivi

O corelație pozitivă ușoară s-a putut remarca între gradul displaziei și gradul de pozitivitate a Melan A (fig. 93), cu un $r = 0,48$, $p = 0,01$, susținând faptul că Melan A se pozitivizează mai intens în leziunile cu un grad ridicat de activitate, precum nevii displazici sau melanoamele.

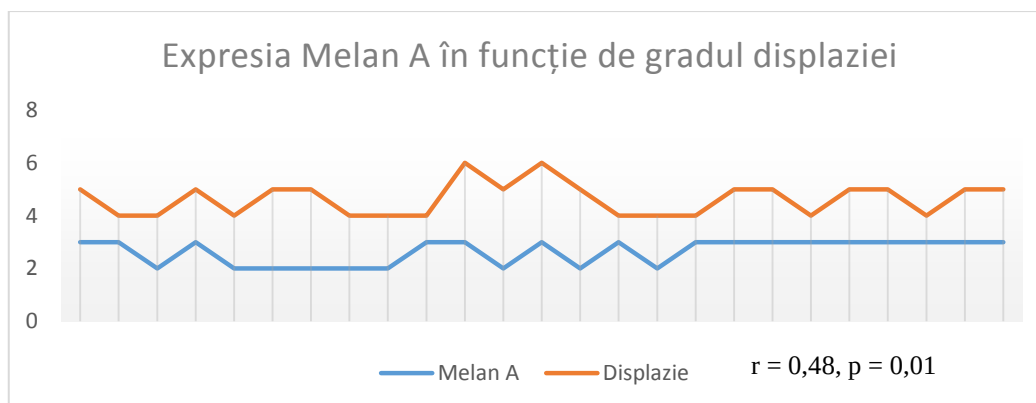


Fig. 93: Distribuția expresiei Melan A în funcție de gradul displaziei

Testul Chi-pătrat a dovedit, în plus, faptul că există o diferență semnificativă statistic între rezultatele obținute și cele așteptate ($p=0.05$) în ceea ce privește pozitivarea Melan A comparativ cu diferitele grade de displazie.

Studiul Bcl-2

Toate cele 27 de leziuni displazice au avut cuiburi nevice care s-au pozitivat cu Bcl-2, fără artefacte de prelucrare. Dintre acestea, opt cazuri au prezentat expresie slabă, zece leziuni au fost moderat pozitive, iar nouă au fost intens pozitive.

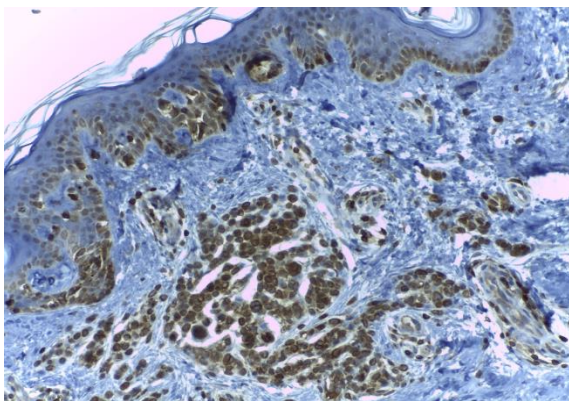


Fig. 98: Nev displazic compus cu expresie moderată, Bcl-2. 200X

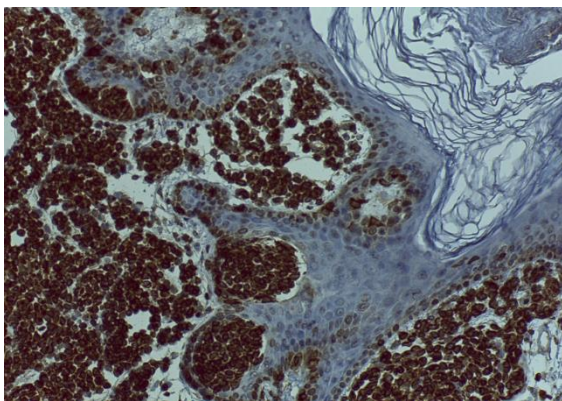


Fig. 99: Nev displazic compus cu expresie Bcl-2 intens pozitivă, 200X

Nu s-au observat nici o diferență între vârstele și dimensiunile medii ale cazurilor Bcl-2 pozitive în comparație cu lotul de studiu (Fig. 95, 96).

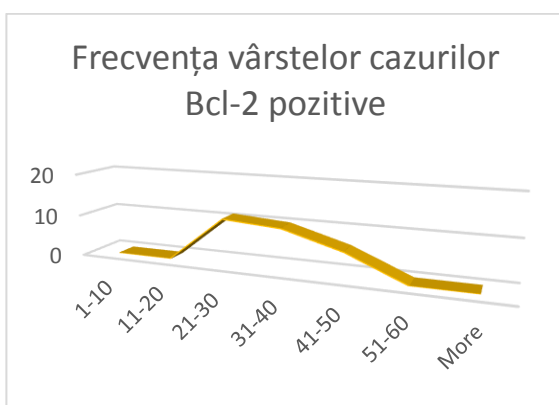


Fig. 95: Frecvența vârstelor în cazurile Bcl-2 pozitive

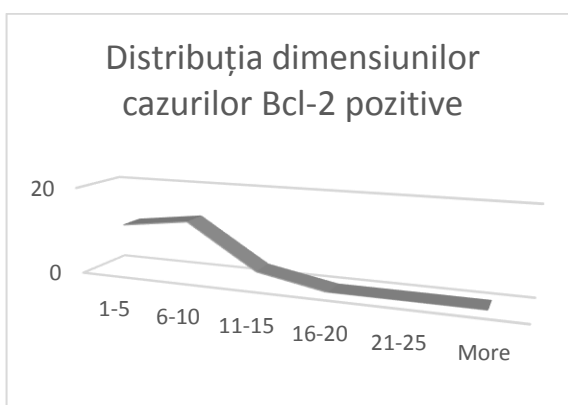


Fig. 96: Distribuția dimensiunilor în cazurile Bcl2 pozitive

Studiul Cyclin D1

În ceea ce privește imunotiparea Cyclin D1, o pozitivitate slabă s-a putut observa în 12 cazuri, 10 cazuri prezentând pozitivitate moderată, trei cazuri fiind negative (Fig. 100). În schimb, nici un caz nu a fost intens pozitiv.

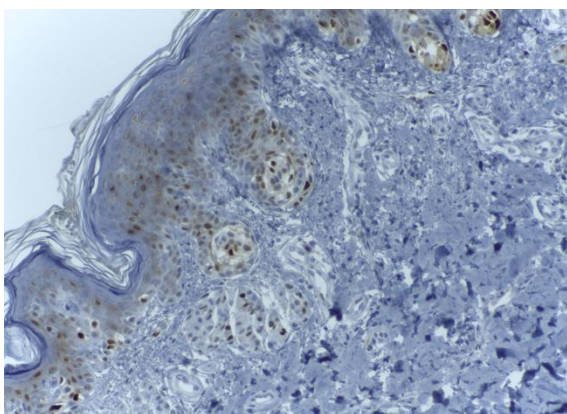


Fig. 104: Nev displazic compus moderat pozitiv Cyclin D1, 200X

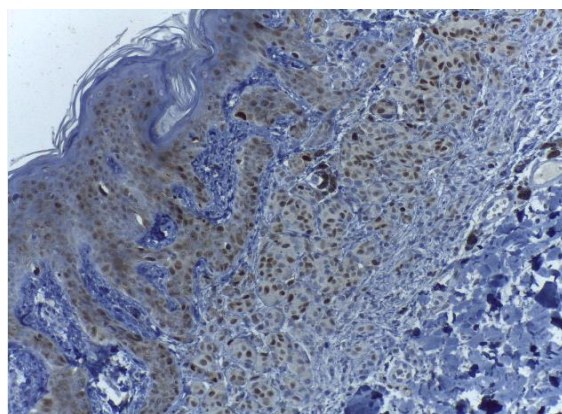


Fig. 103: Nev displazic compus slab pozitiv Cyclin D1, 200X

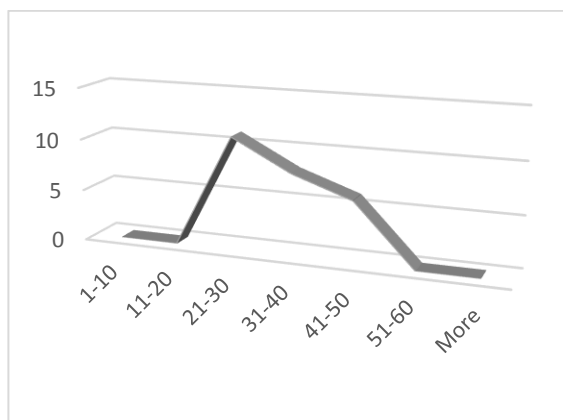


Fig. 101: Distribuția vârstelor cazurilor CyclinD1 pozitive

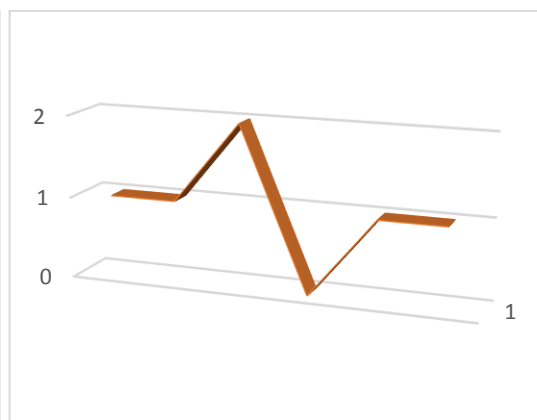


Fig. 102: Distribuția dimensiunilor nevilor Cyclin D1 pozitivi

Nu s-au observat nici o diferență între vârstele și dimensiunile medii ale cazurilor Cyclin D1 pozitive în comparație cu lotul de studiu.

În schimb, s-a determinat o corelație pozitivă slabă între gradul pozitivării Cyclin D1 și vârsta pacienților ($r = 0,35$, $p=0.08$). (fig.105)

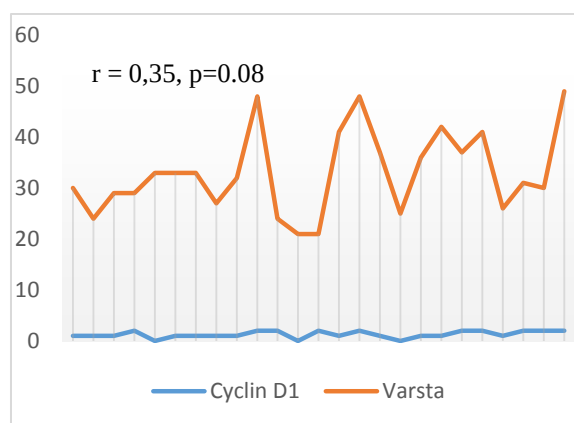


Fig. 105: Corelație Cyclin D1 și vârsta pacienților

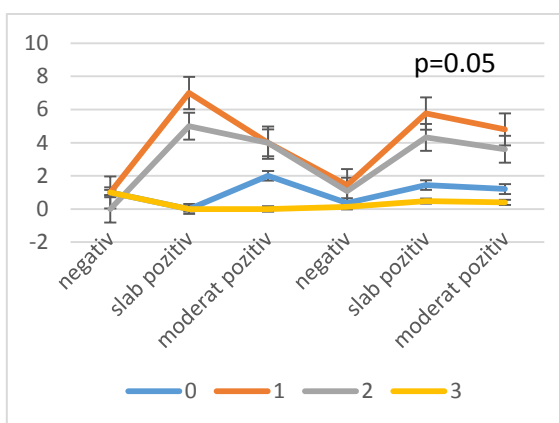


Fig. 106: Tendințele de dispunere a leziunilor în funcție de pozitivitate și infiltrat inflamator

Aplicând testul Chi-pătrat, s-a demonstrat și o diferență semnificativă între gradul de pozitivitate și gradul infiltratului inflamator ($p=0.05$) (fig. 106).

Totodată, există o diferență semnificativă între cazuri Cyclin D1 negative cu diverse grade de inflamație comparativ cu datele așteptate (Chi-test, $p=0.03$).

Studiul p53

Toți nevii incluși în studiu au putut fi evaluați pentru acest markeri. Dintre aceștia, șapte nu au prezentat expresie pozitivă, opt au fost slab pozitivi la p53, tot opt nevi au prezentat o pozitivitate moderată și doar patru au fost intens pozitivi.

Prin aplicarea testului Chi-pătrat s-a demonstrat o diferență semnificativă între gradul de pozitivitate la p53 și gradul displaziei ($p=0.01$), în special în cazul leziunilor intens pozitive ($p=0.00$)

Studiul Ki-67:

În 12 leziuni, Ki-67 a fost pozitiv în aproximativ 1% din celulele tumorale nevice, în restul leziunilor, Ki-67 fiind apreciat ca fiind pozitiv în 5%.

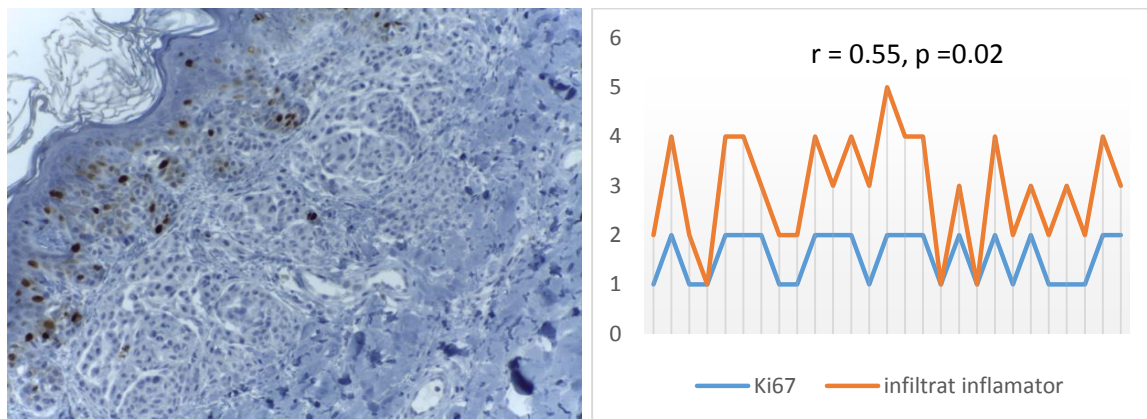


Fig. 111: Nev displazic cu expresie Ki-67 < 5% Fig. 112: Corelația dintre gradul de pozitivitate Ki-67 și nivelul inflamației

O corelație semnificativă statistic a fost demonstrată între procentul de pozitivitate a Ki-67 și nivelul infiltratului inflamator (coeficient Pearson, $r = 0.55$, $p = 0.02$) (Fig. 112). Astfel, cu toate că într-o măsură slabă, se pare că infiltratul inflamator influențează nivelul de diviziune celulară a nevocitelor, fie ca urmare a modificărilor reactiv-regenerative, fie independent de acestea.

O diferență semnificativă între localizarea nevilor și gradul de pozitivitate a Ki-67 a fost semnificativă doar în cazul leziunilor cu localizări speciale ($p=0.05$, Chi-test). Totuși, o diferență semnificativă a fost demonstrată în ceea ce privește leziunile pozitive Ki-67 și gradul inflamației observate ($p=0.03$, Chi-test). (fig. 113, 114).

Studiul receptorilor de estrogen

În cadrul acestui studiu, nici un nev nu s-a pozitivat nuclear la antigenul ER monoclonal PPG5 (RTU-ready to use). Mai mult, o slabă pozitivare s-a putut observa intracitoplasmatic în unele celule epidermice, considerându-se expresie negativă

Studiul corelațiilor între expresiile imunohistochimice a markerilor folosiți în cercetare

- Așa cum a fost demonstrat mai sus, expresia Melan A este independentă de expresia HMB45 în cadrul nevilor displazici studiați.
- În schimb, o corelație pozitivă moderată și semnificativă statistic a fost demonstrată între markerii Melan A și Bcl-2 ($r(23)=0.55$, $p=0.004$) (Fig. 116)

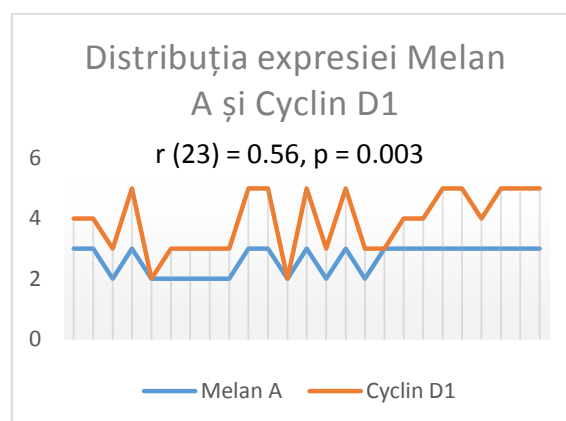
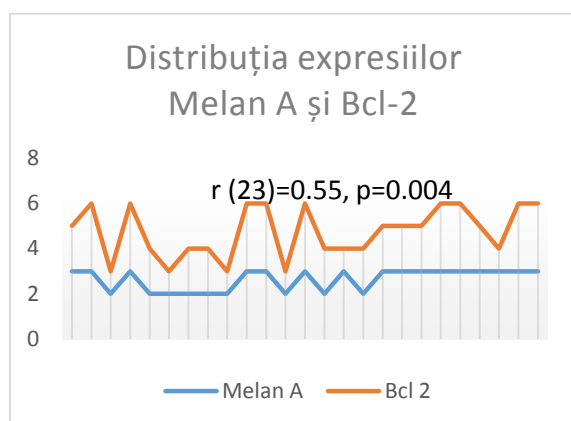


Fig. 116: Distribuția expresiilor Melan A și Bcl-2 Fig. 117: Distribuția expresiei Melan A și Cyclin D1

- Totodată, o corelație între Melan A și Cyclin D1 a fost demonstrată, cu un $r(23) = 0.56$, $p=0.003$ (fig. 117)
- În schimb, nu s-a obținut nici o corelație semnificativă statistic între Melan A și p53 ($r(23)=0.15$, $p = 0.4$).
- Nici între Melan A și Ki-67 nu a existat vreo asociere relevantă ($r(23) = 0.22$, $p = 0.29$).
- După cum a fost deja demonstrat, Bcl2 se exprimă total independent față de HMB45 dar se asociază pozitiv cu expresia Melan A.
- Bcl 2 se mai asociază slab pozitiv și cu Cyclin D1 ($r(24)=0.48$, $p=0.01$) (Fig. 118)

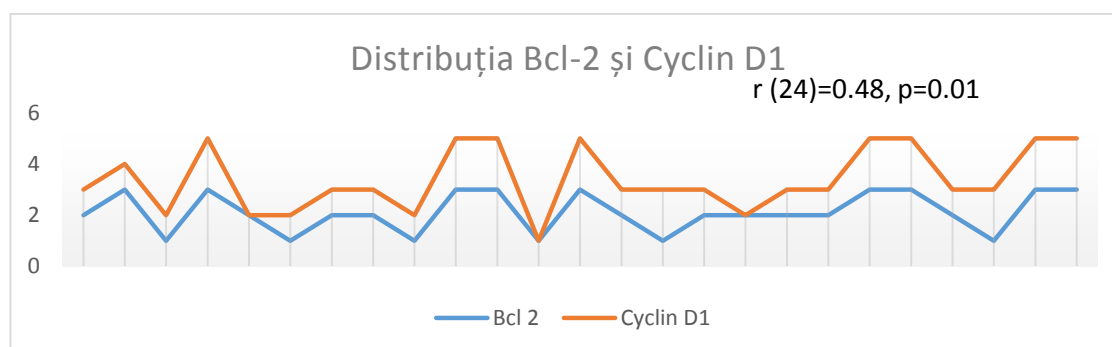


Fig. 118: Distribuția Bcl-2 și Cyclin D1

- Bcl2 nu se asociază cu p53 ($r(25) = 0.15$, $p=0.44$) și nici cu Ki-67 ($r(25) = 0.13$, $p = 0.49$),

- Cyclin D1 nu se asociază în nici o variantă cu p53 sau cu Ki-67 ($r(23) = 0.08$, $p=0.7$, respectiv $r(23) = 0.07$, $p=0.7$)),
- Totodată, s-a demonstrat o corelație pozitivă, semnificativă statistic Ki-67 și p53, însă slabă din punct de vedere al consistenței studiului ($r(25) = 0.36$, $p=0.06$) (Fig. 119).

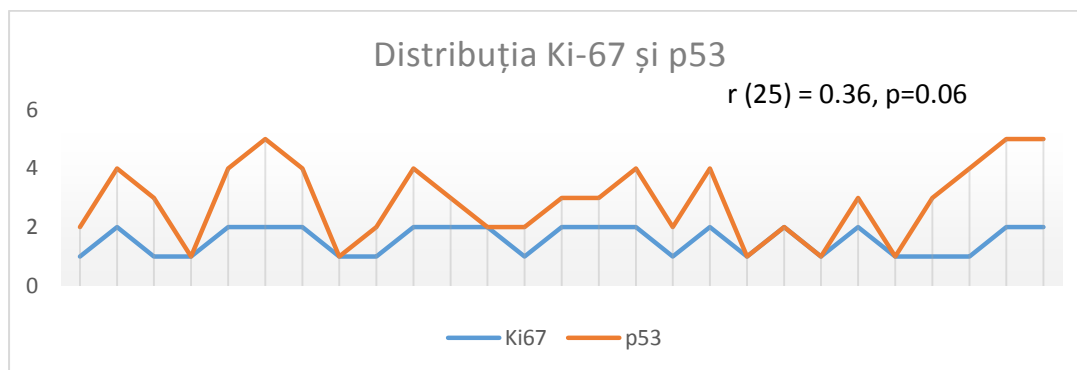


Fig. 119: Distribuția Ki-67 și p53

Aspecte de microscopie electronică

În cadrul studiului de față s-au realizat și analize de microscopie electronică în vederea descrierii complete a nevilor atipici. Specificitatea acestor leziuni se traduce electrono-microscopic prin prezența melanozomilor anormali într-un număr crescut și a complexelor melanozomale-macromelanozomi.

Leziunea displazică a prezentat, așa cum apare și în literatura de specialitate, melanozomi atipici, mari, cu melanină electrono-densă dispusă dezorganizat, frecvent în structuri rotund-ovalare și elipsoidale (Fig. 121).

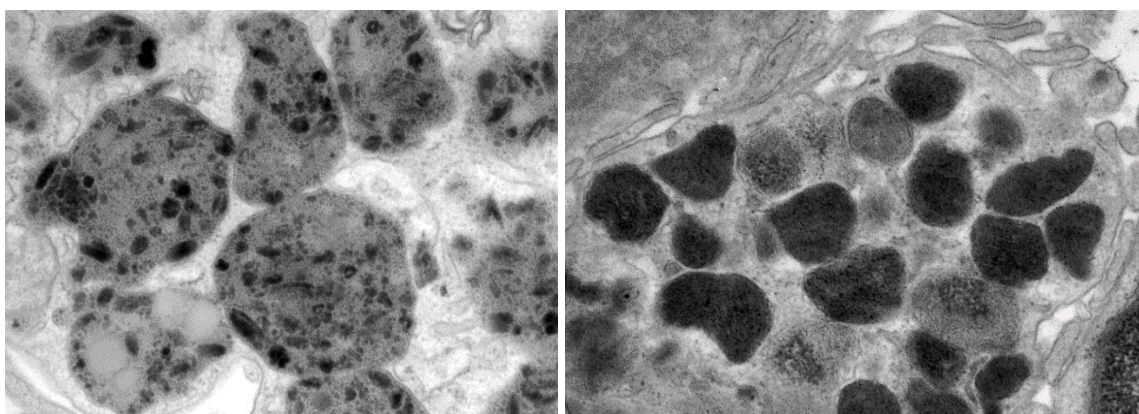


Fig. 121: Melanozomi aberanți – structuri rotunde, unele neregulate, cu material electrono-dens

Complexele macromelanozomiale au putut fi observate cu ușurință, așa cum se arată în Fig. 122, ele reprezentând cel mai probabil, acumulări anormale formate din mai mulți melanozomi aberanți.

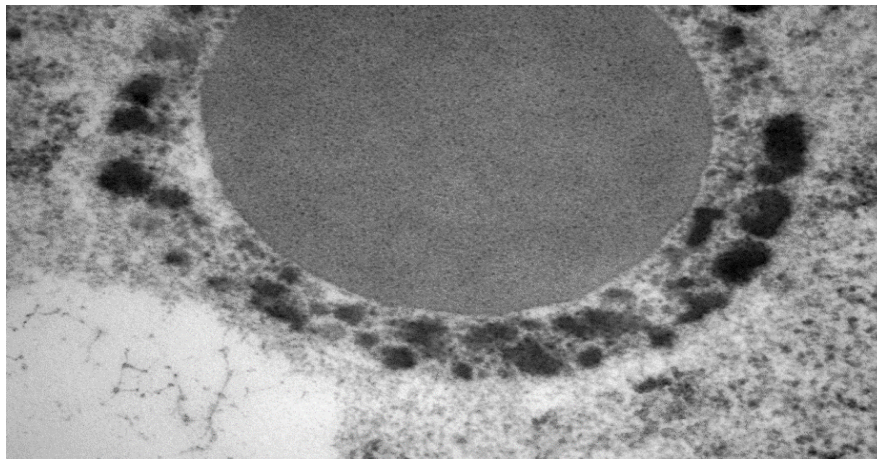


Fig. 122: Structură macromelanozomală cu material amorf dispus central, fără delimitare clară față de structurile învecinate

Concluzii generale

1. Pentru nevii displazici, s-au observat diferențe semnificative statistic între vârstele pacienților cu leziuni localizate la nivelul extremității cefalice (23 ani) și cele localizate la nivelul toracelui posterior (30,29 ani), a toracelui anterior (32,72 ani), a abdomenului (33 ani), a membrilor inferioare (42,66 ani) precum și față de cei cu localizări speciale (32,5 ani). Nevii regiunii cefalice s-au încadrat în decada a treia de viață, în comparație cu restul localizarilor enunțate care s-au situat în decadele patru și chiar cinci de viață.
2. Vârstele pacienților cu nevi displazici localizați la nivelul membrilor inferioare au variat semnificativ față de cei de pe toracele posterior, anterior, abdomen, membre superioare sau față de pacienții cu nevi cu localizări speciale. Aceștia au fost mai frecvenți la pacienții din decada a cincea de viață, în comparație cu celelalte localizări enunțate. Totodată, vârstele pacienților cu nevi pe toracele posterior au variat semnificativ față de pacienții care au prezentat nevi abdominali.
3. Diferențe semnificative statistic au fost observate în ceea ce privește dimensiunile nevilor displazici cu diferite localizări, astfel: nevi localizați la nivelul capului și gâtului au fost mai mici (4,42 mm) decât cei localizați pe abdomen (6,65 mm) sau acral, pe linii mamare și genital (6,29 mm), dar ușor mai mari decât cei de pe membrele inferioare

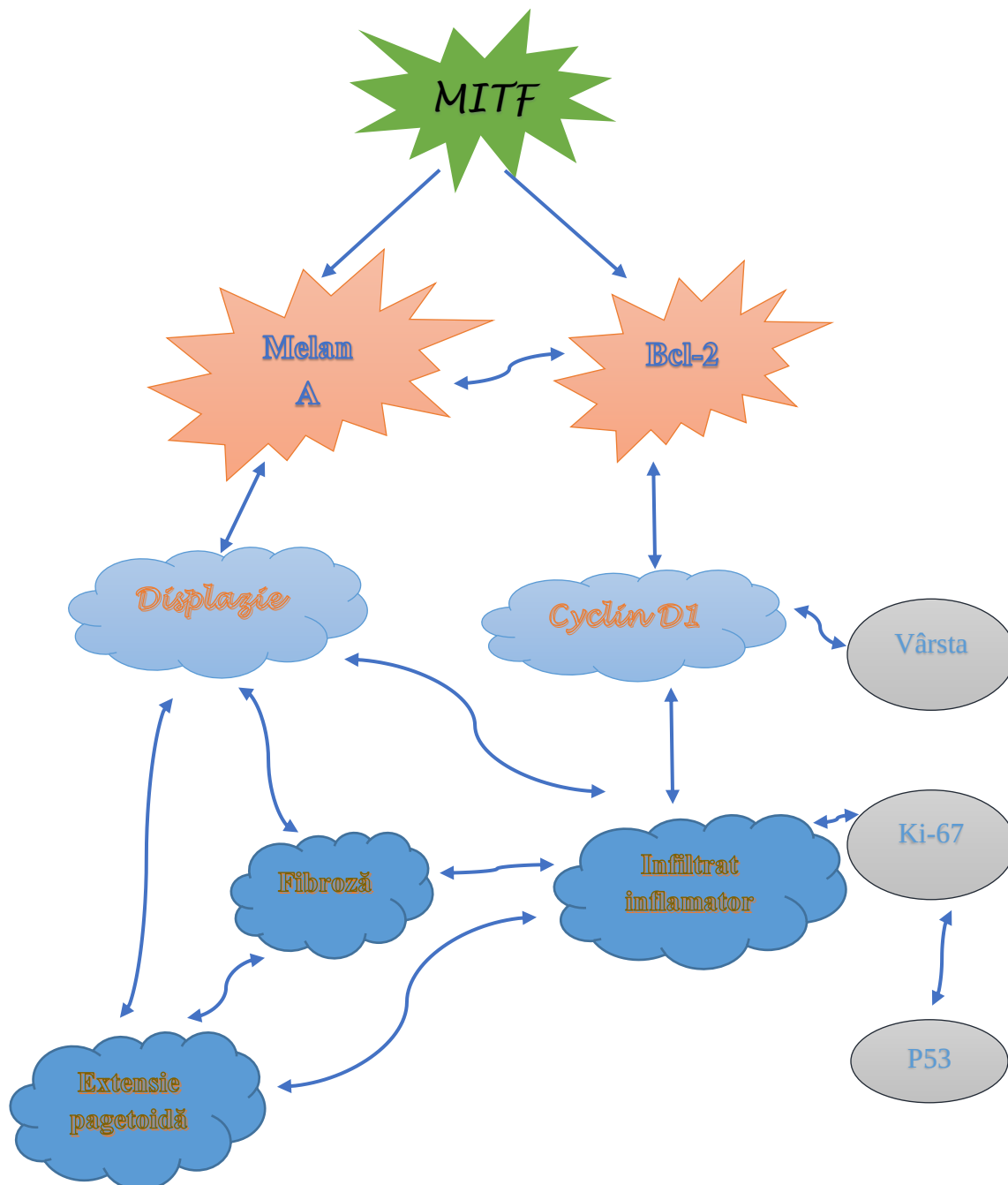
(4,14 mm). Nevii de pe toracele posterior au prezentat dimensiuni (5,55 mm) mai mici decât cei localizați pe abdomen. Nevii localizați pe membrele inferioare au prezentat cele mai mici dimensiuni, atât față de extremitatea cefalică, cât și față de cei localizați la nivelul toracelui posterior, abdomen sau față de cei cu localizări speciale. Ținând cont de dimensiunile prezentate, nu putem susține teoria conform căreia nevi displazici localizați în zonele frecvent foto-expuse evoluează, ca dimensiuni, mai mult decât cei de pe zone rar expuse radiațiilor solare.

4. Nu s-a evidențiat o distribuție a displaziei în funcție de sex și nici corelații cu vârstele pacienților.
5. Există, totuși, diferențe semnificative statistic între dimensiunile nevilor cu displazie ușoară (4,72 mm) și moderată (5,83), precum și între cei cu displazie ușoară și severă (7,15 mm), gradul displaziei corelându-se, în schimb, slab cu dimensiunile.
6. S-a demonstrat, în studiul de față, o diferență semnificativă între vârstele pacienților cu nevi cu infiltrat inflamator sever (22, 83 de ani vârsta medie) în comparație cu celelalte categorii de nevi displazici studiați.
7. Diferențe semnificative s-au dovedit și în cazul nevilor subcategorizați în funcție de extensie și tip histologic.
8. S-a dovedit în studiul de față, că există o corelație moderată ($r(142)=0.36$) între gradul displaziei și al fibrozei; astfel, cu cât displazia crește în grad, cu atât fibroza, atât lamelară, cât și cea concentrică, apare în cantitate mai crescută.
9. Totodată, displazia s-a corelat pozitiv și cu gradul infiltratului inflamator ($r=0.37$) și cu existența extensiei pagetoide ($r=0.40$), putând concluziona că ultimile două sunt aspecte ce indică și pot ajuta în categorizarea corectă a unei astfel de leziuni.
10. Și infiltratul inflamator s-a corelat pozitiv cu gradul fibrozei ($r=0.43$) și cu existența extensiei pagetoide ($r=0.42$), existând, după cum se discută și în literatura de specialitate, un trigger comun sau o componentă ce unește toate cele trei aspecte histopatologice (fibroză-infiltrat inflamator, extensie pagetoidă) cu displazia. Nu s-a dovedit nici o corelație, însă, între gradul fibrozei și aspectele de extensie pagetoidă.
11. S-a dovedit o corelație pozitivă moderată între gradul displaziei și gradul de pozitivare ($p=0.01$), susținând observațiile proprii și, mai puțin din literatura de specialitate, care atenstă faptul că Melan A se pozitivează mai intens în celulele active, în cuiburile joncționale și în leziunile mitotice active.

12. Totodată, prin testul Chi-pătrat, s-a confirmat diferența semnificativă statistic între gradul displaziei și gradul de pozitivitate a Melan A comparativ cu rezultatele așteptate ($p=0.05$).
13. S-a demonstrat o asociere slabă între gradul de pozitivare a Cyclin D1 și vârsta pacienților, rezultat care necesită mai multe studii pentru a putea fi corect explicat și înțeles.
14. Prin testul Chi-pătrat s-a punctat și diferența între gradul de pozitivare a Cyclin D1 și gradul infiltratului inflamator ($p=0.05$), subliniind lotul de pacienți cu Cyclin D1 negativ, a cărei diferență față de rezultatele așteptate este semnificativ diferită.
15. Diferențe semnificative statistic au fost demonstrate și în ceea ce privește gradul de pozitivare a p53 și gradul displaziei ($p=0.01$), în special în cazul leziunilor intens pozitive ($p=0.001$). Acest aspect ar putea susține teoria conform căreia p53 apare, mai frecvent și în mod specific, în tumorile maligne sau cu potențial de evoluție malign, lucru demonstrat deja în cadrul altor tipuri de patologii.
16. Expresia Ki-67 a fost corelată pozitiv cu nivelul infiltratului inflamator ($r=0.55$, $p=0.03$), explicat în parte prin modificările celulare cito-nucleare care apar ca urmare a acțiunii celulelor inflamatorii și a mediatorilor inflamației asupra nevocitelor.
17. Totodată, gradul de pozitivare a markerului Ki-67 în funcție de localizare este semnificativ diferit, fapt demonstrat prin testul Chi-pătrat cu preponderență pentru leziunile cu localizări speciale.
18. Receptorul α estrogenic a fost complet negativ în toate leziunile cercetate, detronând ideea conform căreia hormonii estrogenici influențează gradul displaziei, și că ei ar putea constitui markeri relevanți în diagnosticul și prognosticul leziunilor melanocitare atipice.
19. Melan A s-a asociat pozitiv moderat cu Bcl-2, asociere explicată prin existența proteinei MiTF ce acționează atât pe pmel17, pe MLANA, cât și pe Bcl-2, cu rol în dezvoltarea și supraviețuirea melanocitelor și a melanoblastelor.
20. O asociere pozitivă importantă a fost demonstrată și între Melan A și Cyclin D1 (coeficient Pearson = 0.56, $p=0.003$).
21. Bcl-2 se corelează pozitiv moderat cu imunoexpresia Cyclin D1 (coeficient Pearson = 0.48, $p=0.01$).
22. Între p53 și Ki-67 s-a demonstrat o corelație slabă, cu un coeficient de 0.36 și un p discutabil de 0.06.

23. Cele mai multe leziuni au prezentat aspecte de fibroză de grad moderat (grad 2), o altă parte prezentând fibroză ușoară. Din punct de vedere al localizărilor, se poate observa o tendință de distribuție a nevilor în funcție de gradele de fibroză.

În vederea înțelegerii mai concrete a rezultatelor obținute și a legăturilor dintre diverși anticorpi, am realizat diagrama de mai jos (Fig. 127)



Bibliografie:

1. Gilbert F Scott . Developmental Biology, 6th edition, Sinauer Associates; 2000. Capitolul 13, The Neural Crest
2. Mort RL, Jackson IJ, Patton EE., The melanocyte lineage in development and disease. Development. 2015 Feb 15;142(4):620-32.
3. Uong A, Zon LI. Melanocytes in development and cancer. J Cell Physiol. 2010 Jan;222(1):38-41.
4. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Heterogeneity of neural crest-derived melanocytes, Central European Journal of Biology, April 2013, Volume 8, Issue 4, pp 315-330
5. Renato G. Staricco, Mechanism of Migration of the Melanocytes from the Hair Follicle Into the Epidermis Following Dermabrasion, J Invest Dermatol. February 1961, Volume 36, Issue 2, Pages 99–104,
6. Mishima Y, Widlan S., Embryonic development of melanocytes in human hair and epidermis. Their cellular differentiation and melanogenic activity. J Invest Dermatol. 1966 Mar;46(3):263-77.
7. Mills E Stacey, Histology for Pathologists, 3rd Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pg 4-56
8. Ackerman A. Bernard, Böer Almut, Bennin Bruce, Gottlieb Geoffrey J., Histologic Diagnostic Of Inflammatory Skin Diseases, An Algorithmic Method Based on Pattern Analysis, Third Edition, Ardor Scribendi, 2005
9. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: biology and development. Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii I Alergologii. 2013;30(1):30-41.
10. Ross H Michael, Pawlina Wojciech, Histology – A Text and Atlas, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, pg 448-469
11. Elder E. David, Johnson B Jr., Elenitsos R, Lever's Histopathology of the Skin, 9th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, pg 17 – 20,
12. Barnhill R.L, Piepkorn M, Busam K. J., Pathology of Melanocytic Nevi and Melanoma, 3rd Edition, Springer, 2014, pg 1-12, 87-90
13. Grant- Kels M. J., Color atlas of Dermatopathology, informa Healthcare, 2007, pg 247-278
14. Marghoob AA, Nevogenesis – Mechanism and Clinical Implications of Nevus Development, Springer, 2012, pg 1-25
15. Grichnik JM. Melanoma, nevogenesis, and stem cell biology. J Invest Dermatol. 2008 Oct;128(10):2365-80.
16. Richard J. Reed Herbert Ichinose, Wallace H. Clark Jr, Martin C. Mihm Jr., Common and uncommon melanocytic nevi and borderline melanomas Semin Oncol. 1975 Jun;2(2):119-47
17. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M., A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. Hum Pathol. 1984 Dec;15(12):1147-65.
18. Marghoob A. Ashfaq, Nevogenesis – Mechanism and Clinical Implications of Nevus Development, pg 27, ed Springer, 2012
19. Wolff K., Goldsmith A. L., Paller S. A., Leffell J. D., Fitzpatrick's Dermatology in general medicine, 7th Edition, McGraw Hill, 2008, pg 591-607, pg 1099 - 1133

20. Clark WH Jr., Reimer RR, et al, Origin of Familial Malignant Melanomas From Heritable Melanocytic Lesions 'The B-K Mole Syndrome', *Arch Dermatol.* 1978;114(5):732-738. doi:10.1001
21. Lynch HT, Frichot CB, Lynch JF, Familial atypical multiple mole-melanoma syndrome *Journal of Medical Genetics*, 1978, 15, 352-356
22. Duffy Keith, Grossman Douglas, The dysplastic nevus: from historical perspective to management in the modern era I. Historical, histologic, and clinical aspects, *J Am Acad Dermatol.* 2012 Jul; 67(1): 1.e1–18.
23. Palamaras Ioulios, Atypical Mole (Dysplastic Nevus), *Orphanet Encyclopedia*, April 2004
24. Leon Alexandre, dysplastic Nevus (atypical nevus) – Nevo displasico (Nevo atípico), *An Bras Dermatol.* 2010;85(6):863-71.
25. Silva JH, Soares de Sa´ BC, Ribeiro de A´ vila AL et al., Atypical mole syndrome and dysplastic nevi: identification of populations at risk for developing melanoma - review article, *Clinics* 2011;66(3):493-499
26. Marinkovic M, Jajic Z, Nikolic J, Dysplastic Nevus – a risk factor of developing skin melanoma, *Clinica; and EpiDermiological Study with Retrospective review of the Literature, Med Pregl* 2011; LXIV (5-6): 315-318. Novi Sad: maj-juni
27. Landi MT, Baccarelli A., Tarone RE., DNA Repair, Dysplastic Nevi, and Sunlight Sensitivity in the Development of Cutaneous Malignant Melanoma, *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 94, No. 2, January 16, 2002
28. Barhill Raymond L., Crowson NA, Magro CM, Piepkorn MW, *Dermatopathology*, pg 651-670, Editia a 3a, The McGraw-Hill Companies, Inc, 2010,
29. Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, et al, *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, pg 1126, 7th Edition, The McGraw-Hill Companies, Inc, 2008
30. Habif P. Thomas, *Clinical Dermatology- A Color Guide to Diagnosis and Therapy*, Capitol 22, Editia a 4a, Mosby Inc., 2004
31. Mooi J Wolter, The dysplastic naevus, *J Clin Pathol* 1997;50:711-715
32. Prieto V.G., Immunohistochemistry and molecular biology in the management of melanocytic lesions, *Pigmented lesions of the skin, Rev Esp Patol* 1999; Vol. 32, NP 3
33. Martinez-gonzalez S., Raventos A., Pedragosa R., Huguet P., Expresion de antígeno HMB-45 y antígeno nuclear de proliferacion celular (PCNA) como posibles factores pronostico en los nevus displasicos. *Estudio inmunohistoquimico en dos hermanas gemelas.*, *Patologia* 1996;29:209-215
34. Fuertes L., Santonja C., Kutzner H., Requena L., Immunohistochemistry in Dermatopathology: A Review of the Most Commonly Used Antibodies (Part I), *Actas Dermosifiliogr.* 2013;104(2):99---127
35. Busam KJ, Chen YT, Old LJ, et al., Expression of melan-A (MART1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma., *Am J Surg Pathol.* 1998 Aug;22(8):976-82.
36. Prieto G. Victor, Shea R. Christopher, Immunohistochemistry of Melanocytic Proliferations, *Arch Pathol Lab Med—Vol 135*, July 2011
37. Busam KJ, Jungbluth AA., Melan-A, a new melanocytic differentiation marker., *Adv Anat Pathol.* 1999 Jan;6(1):12-8.
38. Berset Magali, Cerottini Jean-Philippe, Guggisberg David, Expression of Melan A/MART-1 Antigen as a Prognostic Factor in Primary Cutaneous Melanoma, *Int. J. Cancer: 95*, 73–77 (2001)
39. Kucher C, Zhang PJ, Pasha T, et al., Expression of Melan-A and Ki-67 in desmoplastic melanoma and desmoplastic nevi., *Am J Dermatopathol.* 2004 Dec;26(6):452-7.

40. Leinweber B, Hofmann-Wellenhof R, Kaddu S, McCalmont TH., Procollagen 1 and Melan-A expression in desmoplastic melanomas., *Am J Dermatopathol.* 2009 Apr;31(2):173-6.
41. Fuertes L., Santonja C., Kutzner H., Requena L., Immunohistochemistry in Dermatopathology: A Review of the Most Commonly Used Antibodies (Part II), *Actas Dermosifiliogr.* 2013;104(3):181---203
42. Zhuang Liqing, Lee C Soon, Scolyer A. Richard, Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma., *Modern Pathology* (2007) 20, 416–426
43. Tron V. A., Krajewski S., Klein-Parker H., et al., Immunohistochemical Analysis of Bcl-2 Protein Regulation in Cutaneous Melanoma, *American Journal of Pathology*, Vol. 146, No. 3, March 1995
44. Albino AP, Vidal MJ, McNutt NS, et al., Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma., *Melanoma Res.* 1994 Feb;4(1):35-45.
45. Houben R, Hesbacher S, Schmid CP, et al, High-level expression of wild-type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter gene assays. *PLoS One.* 2011;6(7):e22096.
46. Box F.N, Vukmer TO, Terzian T., Targeting p53 in melanoma., *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014 Jan; 27(1): 8–10.
47. Batinac Tanja, Hadzisejdic Ita, Brumini Gordana, et al. Expression of Cell Cycle and Apoptosis Regulatory Proteins and Telomerase in Melanocytic Lesions., *Coll. Antropol.* 31 (2007) Suppl. 1: 17–22
48. Lassam N. J., From L., Kahn H. J., Overexpression of p53 Is a Late Event in the Development of Malignant Melanoma., *Cancer Research* 53. 2235-2238. May 15. 1993
49. Stretch R. Jonathan, Gatter C. Kevin, Ralfkiaer Elisabeth, et al., Expression of Mutant p53 in Melanoma., *Cancer Research* 51, 5976-5979. November 1. 1991
50. Inoue T Wu L, Stuart J, Maki CG., Control of p53 nuclear accumulation in stressed cells., *FEBS Lett.* 2005 Sep 12;579(22):4978-84.
51. Li X, Tsuji T, Wen S, Sobhan F, Wang Z, Shinozaki F, Cytoplasmic expression of p53 protein and its morphological features in salivary gland lesions., *J Oral Pathol Med.* 1995 May;24(5):201-5.
52. Jansson A, Gentile M, Sun XF., p53 Mutations are present in colorectal cancer with cytoplasmic p53 accumulation. *Int J Cancer.* 2001 May 1;92(3):338-41.
53. Ewanowich Carol, Brynes K. Russell, Medeiros L. Jeffrey et al., Cyclin D1 Expression in Dysplastic Nevi An Immunohistochemical Study, *Arch Pathol Lab Med.* 2001;125:208–210
54. Asadi-Kani Zahra, Nasiri Soheila, Vessal Parvaneh et al., A comparative study of estrogen receptor beta expression in melanoma and benign melanocytic lesions., *Iran J Dermatol* 2012; 15: 4-6
55. Ohata C, Tadokoro T, Itami S., Expression of estrogen receptor beta in normal skin, melanocytic nevi and malignant melanomas., *J Dermatol.* 2008 Apr;35(4):215-21
56. Raposo Graça, Marks Michael S., Melanosomes – dark organelles enlighten endosomal membrane transport, *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Oct; 8(10): 786–797.
57. Rhodes AR, Seki Y, Fitzpatrick T, et al., Melanosomal Alterations in Dysplastic Melanocytic Nevi A Quantitative, Ultrastructural Investigation., *Cancer* 61:358-369, 1988.
58. Vicente Ortega V, Martínez Díaz F, Carrascosa Romero C, et al., Abnormal melanosomes: ultrastructural markers of melanocytic atypia., *Ultrastruct Pathol.* 1995 Mar-Apr;19(2):119-28.

59. Nakatani T., Beitner H., A Transmission Electron Microscopic Study of Macromelanosomes in Sporadic Dysplastic Nevi, *Okajimas Folia Anat.Jpn.*, 69(2-3)§ 109-114, August 1992
60. Takahashi H., Horikoshi T., Jimbow K., Fine Structural Characterization of Melanosomes in Dysplastic Nevi., *Cancer* 56:111-123, 1985.
61. Massi Guido, LeBoit E. Philip, *Histological Diagnosis of Nevi and Melanoma*, Steinkopff Verlag Darmstadt, 2004, pg 265
62. Barhill Raymond L., Crowson NA, Magro CM, Piepkorn MW, *Dermatopathology*, pg 124-128, Editia a 3a, The McGraw-Hill Companies, Inc, 2010
63. Roesch A, Burgdorf W, Stolz W, Landthaler M, Vogt T., Dermatoscopy of "dysplastic nevi": a beacon in diagnostic darkness. *Eur J Dermatol.* 2006 Sep-Oct;16(5):479-93.

LISTA ARTICOLE PUBLICATE IN CADRUL CERCETARII

1. The importance of fibrosis and inflammatory infiltrate in dysplastic nevi, **Patrascu O.M.**, Costache M., Dumitru A. , Tampa M., Georgescu S.- R., Matei C., Sajin M., Simion G., Lazaroiu A.M., Medicine in Evolution Volume XXII, No. 2, 2016 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5394496/>
2. Expression of Bcl-2, Melan A and HMB-45 in Dysplastic Nevi. **Oana Maria Patrascu**; Mariana Costache; Adrian Vasile Dumitru; Corina Nicoleta Mehotin; Maria Sajin; Anca Mihaela Lazaroiu, Maedica - a Journal of Clinical Medicine, 2016; 11(5): 38-43 - http://medicineinevolution.umft.ro/2016/rev_2_2016.pdf