

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
DOMENIUL MEDICINĂ**

*Tehnici moderne de investigare ale melanomului*

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:  
PROF. UNIV. DR. COSTACHE MARIANA**

**Student-doctorand:  
ALI LEILA**

**2020**

## CUPRINS

Lista lucrărilor științifice publicate .....	iii
Lista de abrevieri și simboluri .....	iv
Introducere.....	1
I. PARTEA GENERALĂ.....	7
1. Melanomul. Considerații generale. ....	8
1.1. Epidemiologie .....	8
1.2. Etiologie .....	8
1.3. Fiziopatologia melanomului.....	10
1.4. Histogeneza melanomului .....	12
1.5. Tipuri histopatologice de melanom.....	18
1.6. Diagnosticul leziunilor melanocitare.....	19
1.7. Prognostic și stadializare .....	26
1.8. Tratamentul în melanom.....	29
2. Tehnici moderne de investigare ale melanomului.....	33
2.1. Diagnostic imunohistochimic.....	33
2.2. Diagnostic molecular.....	36
2.3. Hibridizare genomică comparativă.....	41
2.4. Hibridizare in situ în fluorescență .....	42
2.5. Markerii moleculari de prognostic .....	44
2.6. Analiză digitală.....	47
2.7. Micromatrici tisulare .....	49
3. Direcții actuale de cercetare științifică în domeniul melanomului.....	54
II. PARTEA SPECIALĂ. CONTRIBUȚII PERSONALE .....	55
4. Studiul 1: Avantajele metodelor digitale în raportarea factorilor de histoprognostic în melanom .....	56
4.1. Studiul 1.1. Stabilirea acurateței și preciziei măsurărilor în format digital în evaluarea melanomului .....	57
4.1.1. Introducere.....	57
4.1.2. Material și metodă .....	57
4.1.3. Rezultate .....	59
4.1.4. Discuții studiul 1.1.....	62

4.2. Studiul 1.2. Analizarea avantajului metodelor digitale în raportarea factorilor de histoprognoză prin evaluarea digitală a profunzimii invaziei în melanom utilizând diferiți markeri IHC și aprecierea utilității clinice .....	65
4.2.1. Introducere.....	65
4.2.2. Material și Metodă.....	65
4.2.3. Rezultate .....	77
4.2.4. Discuții studiul 1.2.....	79
4.3. Concluzii studiul 1.....	81
5. Studiul 2: Evaluarea profilului IHC și investigarea statusului mutațional în melanoamele primare versus melanoamele metastatice. ....	83
5.1. Studiul 2.1. Abordarea analizei IHC în cazul unor localizări rare ale melanomului....	83
5.1.1. Introducere.....	83
5.1.2. Material și metodă .....	84
5.1.3. Rezultate .....	86
5.1.4. Discuții studiul 2.1 .....	106
5.2. Studiul 2.2. Investigarea statusului mutațional în melanoamele metastatice coroborat cu profilul IHC .....	115
5.2.1. Introducere.....	115
5.2.2. Material și metodă .....	115
5.2.3. Rezultate .....	117
5.2.4. Discuții studiul 2.2.....	124
5.3. Concluzii studiul 2.....	127
6. Studiul 3: Analiza FISH cu 4 sonde folosind tehnica TMA în studiul comparativ melanoame versus nevi nevocelulari.....	129
6.1. Material și metodă .....	130
6.2. Rezultate .....	135
6.3. Discuții .....	168
6.4. Concluzii studiul 3.....	172
7. Concluzii și contribuții personale.....	174
7.1. Concluzii rezultate din obiectivele de cercetare și perspective .....	174
7.2. Evidențierea contribuțiilor proprii.....	178
Bibliografie.....	180
Anexe.....	210

# I. PARTEA GENERALĂ

## Melanomul. Considerații generale.

### Epidemiologie și etiologie

*Incidența:* datele referitoare la incidența melanomului atestă o dublare a incidenței acestuia la fiecare decadă. În România, în ultimii 25 de ani, incidența bolii a crescut de la 1,2 la 4,6 cazuri la 100.000 de locuitori/an, iar între anii 2007-2012, incidența melanomului a înregistrat o creștere cu 0,5% la 100.000 [1]. Global, cifrele depind de factorii de mediu și de caracterele populației, cea mai mare incidență înregistrându-se în regiuni foarte însorite.

În ceea ce privește etiologia melanomului cauza exactă nu este cunoscută. Cel mai probabil este vorba de o asociere de factori. Sunt încredințate atât cauze legate de mediu cât și factori genetici. Factorii epidemiologici predispozanți după Gandini sunt [2]: antecedente heredocolaterale de melanom; antecedente personale de melanom; pielea deschisă la culoare, păr blond sau roșcat, numeroase efelide; expunerea intensă la razele UV în antecedente; femeii de >50 de ani cu antecedente de cancer de sân chimiotratat; imunitate redusă.

### Histogeneza melanomului

Apariția și dezvoltarea leziunilor melanocitare maligne este un subiect de interes ce a generat numeroase teorii. Cele mai populare sunt: *teoria bifazică*, *modelul liniar clasic*, *modelul celulelor stem canceroase*, *model de interconversie și transformarea nev - melanom primar*.

*Teoria bifazică:* această teorie a fost postulată în 1984 de Clark și colaboratori și susține dezvoltarea melanoamelor în două faze de creștere [3]: o primă fază de creșterea radială și o a doua fază, de creștere verticală.

*Modelul celulelor stem canceroase:* acest model propune existența unei subpopulații care posedă anumite caracteristici de celule stem somatice, capabilă să prolifereze și să dea naștere unor celule fiice diferențiate ce vor forma masa tumorală, permițând astfel menținerea creșterii tumorale.

*Model de interconversie:* un alt model, numit model de interconversie, propune teoria conform căreia heterogenitatea tumorală rezultă din exprimarea sau re-exprimarea anumitor gene ca răspuns la stimuli din micro-mediu.

*Transformarea nev - melanom primar:* trecerea de la un nev comun la un nev displazic - deși rară - este plauzibilă și se caracterizează prin expansiunea clonală, reducerea apoptozei și scăderea nivelului de senescență al melanocitelor.

## **Tipuri histopatologice de melanom**

Conform clasificării OMS ediția 2018, sunt definite 9 clase histopatologice de melanom [5].

### **Diagnosticul leziunilor melanocitare**

Diagnosticul leziunilor melanocitare este un proces complex ce utilizează metode clinice (anamneză, examen clinic general, dermatoscopie etc.), metode histopatologice, metode genetice și de biologie moleculară.

*Diagnosticul clinic:* diagnosticul leziunilor melanocitare are la bază aspectul clinic al acestora, la care se adaugă localizarea, genul, vârsta pacientului și evoluția leziunii.

*Diagnostic histopatologic:* examenul histopatologic permite afirmarea naturii melanocitare a tumorii, a caracterelor de malignitate precum și evaluarea indicilor de prognostic.

*Criterii histopatologice:* melanoamele sunt caracterizate printr-o proliferare intra-epidermală dezordonată, în care melanocitele își pierd dispunerea în cuiburi, sunt distribuite difuz, uneori înlocuind keratinocitele prin creștere confluentă sau ascensiune (individuală sau grupată). În melanoame, cuiburi de melanocite pot fi regăsite de-a lungul stratului bazal, dar acestea sunt de obicei variabile ca mărime, fiind distribuite neregulat. Componenta dermică a melanomului poate prezenta o tendință redusă de maturizare. Activitatea mitotică este variabilă, dar atunci când există mitoze, mai ales în porțiunea profundă, trebuie luat în considerare un melanom.

### **Prognostic și stadializare**

*Prognostic:* aproximativ 90% dintre melanoame sunt diagnosticate în stadii non-metastatice. Supraviețuirea la 10 ani în cazul acestora este de 75-80% și cel mai important factor prognostic este reprezentat de grosimea tumorală maximă – indicele Breslow.

*Stadializarea* melanomului se realizează conform AJCC [7]. Pentru realizarea unei stadializări cât mai corecte trebuie să se apeleze la o serie de investigații paraclinice, într-o ordine bine stabilită.

### **Tratamentul în melanom**

Tratamentul leziunilor melanocitare este unul complex, ce implică metode chirurgicale, oncologice și terapii biologice personalizate. La aceasta se adaugă radioterapia, terapiile adjuvante și terapia sistemică în cazul bolii metastatice. Excizia chirurgicală este tratamentul de elecție în terapia melanomului.

## Tehnici moderne de investigare ale melanomului

### Diagnostic imunohistochimic

Imunohistochimia (IHC) este o metodă bazată pe detectarea imuno-enzimatică a antigenelor celulare dintr-un țesut utilizând anticorpi specifici, reprezentând o tehnică utilizată pe scară largă în laboratorul de Anatomie Patologică. IHC este principalul instrument adjuvant ce distinge melanoamele de alte formațiuni tumorale. Astfel, pe lângă markerii tradiționali folosiți în diagnosticul melanoamelor (MART-1, HMB 45, S 100), în prezent se adaugă markeri de tipul p16; SOX-10, PRAME, p75 și tirozinaza [8].

### Diagnostic molecular

Mutațiile ce intră în tumorigeneza melanomului au fost studiate stabilindu-se o serie de gene mutante. Prezența acestora crește riscul de dezvoltare al melanoamelor. Dintre acestea, în prezenta teză, interesul s-a axat în special pe cele identificabile prin tehnici de IHC.

*CDKN2A* este una dintre cele mai importante gene de susceptibilitate pentru melanom, iar mutațiile ei sunt prezente într-o mare parte din melanoamele familiale[9]. Poate fi transcrisă diferit codificând două proteine, P16INK4a și P14ARF, care acționează ca supresoare tumorale, reglând negativ progresia ciclului celular și intervenind pe căile retinoblastomului și respectiv p53.

Numărul de gene mutante identificate în melanoame este crescut, iar dintre acestea se remarcă *EGFR*, *PTEN* și probabil cea mai spectaculoasă *BRAF* – mutație fructificată în tratamentul cu anticorpi monoclonali de tipul Vemurafenib și Dabrafenib. Concordanța între pozitivitatea IHC la proteina rezultată din translația genei mutante *BRAF*<sup>V608E</sup> și examenul PCR atinge în prezent 98% - 99% [10].

Asociat mutațiilor menționate, proliferările melanocitare maligne sunt caracterizate prin creșteri ale numărului de copii ale unor locusuri genice, amplificări dar și câștiguri cromozomiale. Aceste aspecte au permis utilizarea tehnicilor de tip FISH pentru a pune în evidență pierderi și câștiguri de gene. Recent, un test multicolor FISH cu patru sonde s-a dovedit a avea o sensibilitate de 86,7% și respectiv specificitate de 95,4% în leziunile melanocitare [11].

### Hibridizare in situ în fluorescență

Tehnica hibridizării in situ în fluorescență (FISH) permite detectarea și localizarea secvențelor specifice acidului nucleic, direct pe preparate cromozomiale, suspensii celulare sau secțiuni din țesut inclus la parafină [12]. Tehnic constă în utilizarea unor secvențe mici

de ADN monocatenar, denumite sonde, marcate anterior direct sau indirect cu molecule fluorescente (fluorocromi). La final, rezultatele sunt analizate cu ajutorul unui microscop în lumină din spectrul ultraviolet.

### **Markeri moleculari de prognostic**

Există numeroase studii care au încercat să identifice markeri IHC legați de progresia tumorii în melanom [13]. S-a dovedit că evaluarea indicelui de proliferare ki67 în melanoamele cu grosime mică (Breslow < 1 mm) apreciază cel mai eficient evoluția tumorii [15,16]. Alți markeri de prognostic propuși au fost: factorul de transcriere MITF în melanoamele cu grosime intermediară (1 până la 4 mm), sau seturi cu mai mulți markeri care conțin proteine ale ciclului celular (BCL6, ki67, p16INK4a și p27<sup>KIP1</sup>), respectiv molecule implicate în oncogeneza melanomului (ATF2, p21, β-catenină, BCL-2 și fibronectină). Odată cu dezvoltarea și aplicarea sondei multicolore RREB1, MYB, CCND1, s-a descris, faptul că un rezultat FISH pozitiv se corelează cu un risc crescut de metastazare sau deces din cauza melanomului [16].

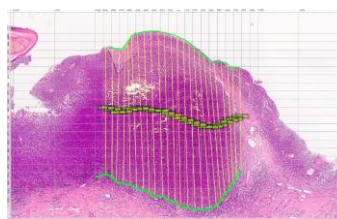
### **Analiză digitală**

Evaluarea factorilor de prognostic și implicit a grosimii maxime (Breslow) este laborioasă și consumatoare de timp, fiind supusă unei variabilității inter-observator.

Analiza digitală computerizată are rolul de obiectivare în sens calitativ și cantitativ a unor parametri histomorfologici ce pot fi supuși unor erori. Lamele virtuale reprezintă procesul de digitalizare al lamelor histopatologice (Figura 1 și Figura 2). Ele se prezintă ca imagini stocate într-o structură multi-rezoluție de tip piramidal. Fișierele conțin mai multe versiuni ale imaginii originale în mărime optică descrescătoare, iar examinarea acestora se realizează utilizând un soft de vizualizare.



*Figura 1 Melanom nodular. Lamă virtuală scanată integral, imunomarcaj Melan A*



*Figura 2 Melanom nodular, Exemplificare a folosirii instrumentului "distanțe" pe o lamă scanată integral, HE, 10x*

### **Micromatrici tisulare**

Micromatricile tisulare (TMA) au devenit încă de la prima descriere de către Wan et al. în 1987 un instrument standard în cercetarea pe țesuturi parafinate [17].

De la prima descriere și până la momentul actual metoda TMA de înaltă densitate a devenit un instrument standard în laboratorul de cercetare pentru identificarea și validarea bio-markerilor de diagnostic și prognostic pentru o varietate de maladii.

## **II. PARTEA SPECIALĂ. CONTRIBUȚII PERSONALE**

### **Studiul 1: Avantajele metodelor digitale în raportarea factorilor de histoprognoștic în melanom**

#### **Ipoteza de lucru și obiective**

În prezent 70% din leziunile invazive se prezintă ca tumori în stadiul T1 [18]. Acest fapt, împreună cu noile definiții ale categoriilor T<sub>1a</sub> și T<sub>1b</sub> din „Manualului de stadializare al cancerului – AJCC ediția 2018”, aduc necesitatea de precizie crescută în măsurarea grosimii tumorale Breslow [19]. În scopul comparării avantajelor metodelor digitale în raportarea factorilor de histoprognoștic în melanom am proiectat un studiu în două părți. Scopul acestui studiu a fost de a compara rezultatele obținute și raportate prin măsurători digitale efectuate pe imagini histopatologice scanate în întregime cu marcaje diferite: Hematoxilină-Eozină (HE), respectiv Melan A și Sox10, într-un eșantion de 105 melanoame cutanate primare și înregistrarea diferențelor semnificative statistice.

*Studiul 1.1* a fost conceput pentru a stabili acuratețea și precizia măsurătorilor față de un standard cunoscut). Ulterior am procedat la analiza comparativă a tehnicii digitale în măsurarea indicelui Breslow pentru lame colorate cu HE, respectiv lame cu imunomarcaj pentru Melan A și Sox10, aceasta reprezentând *Studiul 1.2*.

#### **Studiul 1.1. Stabilirea acurateței și preciziei măsurătorilor în format digital în evaluarea melanomului**

##### **Material și metodă**

Ca model de referință am utilizat o lamă standard folosită în calibrarea spațială a scannerelor pentru microscopul motorizat - lamă model A2A-Tx, producător Leica. Apoi, s-a procedat la efectuarea unor măsurători seriate folosind softurile de analiză digitală uzuale (DIH și AperioImageScope) pentru a stabili acuratețea și precizia a măsurătorilor.

##### **Rezultate**

Valorile medii măsurate au fost 1,002753 mm și 1,0042413 mm cu intervale maxim și minim de 0,9981-1,009 mm și respectiv de 0,9981-1,00888 mm (Figura 3).

În ceea ce privește acuratețea măsurătorilor a rezultat o medie a erorii procentuale de 0,275% pentru DIH, iar pentru AperioImageScope de 0,425%. Acuratețea medie a măsurătorilor a fost de 99,725% pentru DIH și respectiv 99,576% pentru



AperioImageScope. Precizia măsurătorilor a fost de  $1,0027 \pm 0,003$  mm pentru DIH și respectiv  $1,004 \pm 0,0031$  pentru AperioImageScope.

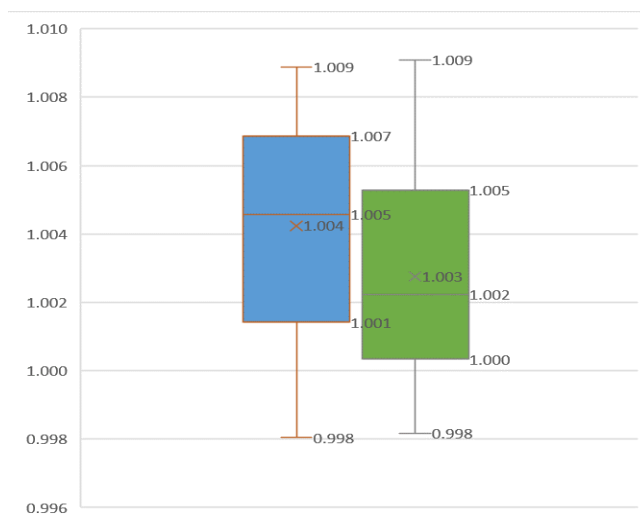


Figura 3 Distribuția intervalelor de valori ale măsurătorilor efectuate pe lamă de calibrare cu miră standard utilizând cele două softuri: DIH și AperioImageScope.

### **Studiul 1.2. Analizarea avantajului metodelor digitale în raportarea factorilor de histoprognoză prin evaluarea digitală a profunzimii invaziei în melanom utilizând diferiți markeri IHC și aprecierea utilității clinice**

În ipoteza de studiu am urmărit analiza diferențelor statistice între măsurătorile efectuate digital în cazul melanoamelor în funcție de imunomarcajul utilizat: Melan A (marker cu expresie citoplasmatică) comparativ cu SOX10 (imunomarcaj specific, de tip nuclear).

#### **Material și Metodă**

Lotul a fost reprezentat de 105 cazuri de melanoame cutanate. Lamele HE au fost revizuite de doi medici anatomopatologi. S-au realizat 2 secțiuni suplimentare pentru fiecare caz, ce au fost marcate apoi cu Melan A și Sox10. Lamele rezultate au urmat un proces de digitalizare. S-au efectuat măsurători digitale, reprezentând cuantificarea distanței maxime între stratul granulos al epidermului și cel mai profund punct al invaziei tumorale.

#### **Rezultate:**

Caracteristicile demografice ale coortei: 47,6% dintre pacienți au fost femei și 52,4% bărbați. Intervalul de vârstă al lotului studiat fost cuprins între 8 și 83 de ani, cu o medie de vârstă de 68,9 ani. Cel mai frecvent subtip histopatologic a fost melanomul nodular (45%), asociat căruia au fost incluse melanoame dificil de măsurat, cum ar melanoame extensive în suprafață cu noduli de creștere pe verticală (35%), melanoame in situ (19%), melanoame

acrale (1%). Ulcerația a fost prezentă în 48% dintre tumori, iar inflamația de tip "brisk" în 62% dintre acestea.

Măsurătorilor digitale au pus în evidență :

- i) Grosimea medie a tumorii a fost: 3,3037 mm pentru măsurătorile efectuate pe lamele colorate cu HE, 3,3198 mm pentru imunomarcaj cu Melan A și respectiv 3,2775 mm pentru Sox10.
- ii) Distribuția pentru stadializarea T. Categoria T1 este cea mai sensibilă, având în vedere că pragul este sub 1 mm.
- iii) În 80% din cazuri, valorile indicelui Breslow pe colorația HE, versus Melan A, versus Sox 10 s-au suprapus.
- iv) Valorile indicelui Breslow înregistrate prin măsurători digitale efectuate pe HE comparativ cu Melan A și Sox 10 nu au arătat variație în categoriile T3-T4, dar au reclasificat 4,7% cazuri din categoriile T1 și T2.
- v) Nu s-au înregistrat diferențe semnificative statistic între grupuri în ceea ce privește valorile indicelui Breslow.

## **Studiul 2: Evaluarea profilului IHC și investigarea statusului mutațional în melanoamele primare versus melanoamele metastatice.**

În această parte a cercetării am efectuat investigarea conduitei de orientare IHC în cazul melanoamelor metastatice și a melanoamelor rare (localizate la nivel digestiv). În acest scop mi-am propus efectuarea a două studii ce au vizat:

*Studiul 2.1:* Abordarea investigațiilor IHC în cazul unor localizări rare ale melanomului (la nivelul tractului gastro-intestinal) cu revizuirea testărilor IHC corelate cu datele clinice, în scopul stabilirii unui algoritm diagnostic.

*Studiul 2.2:* Analiza procesului de gestionare al tumorilor nediferențiate, cu sediu primar necunoscut și evaluarea trăsăturilor care disting melanomul de alte leziuni ce mimează histopatologic această morfologie, cu accent pe algoritmi IHC utili în diagnostic cât și pe testarea mutațiilor *Braf*, *Nras*, *C-kit* precum și pe expresia PD-L1, prin tehnici IHC.

### **Studiul 2.1. Abordarea analizei IHC în cazul unor localizări rare ale melanomului**

#### **Material și Metodă**

Am analizat o serie de 12 cazuri, diagnosticate drept melanoame dezvoltate la nivel digestiv, dintre care 8 fără antecedente cunoscute de melanom cutanat. Au fost reevaluate caracterele clinico-patologice și IHC aplicând tehnici de microscopie optică și digitală în

procesul de reexaminare. Ulterior s-a efectuat analiza statusului mutațional pentru *Braf* și *Nras* precum și testare PD-L1 prin tehnici IHC.

### Rezultate

Manifestările clinice ale pacienților au fost relativ comune pentru simptomatologie digestivă. În seria de cazuri analizată doar patru pacienți au afirmat antecedente patologice persoanele de melanom. Vârsta medie a fost de 63 ani, cu o distribuție egală pe genuri. Proliferările tumorale au fost în medie de 2 cm dimetru. Cea mai frecventă localizare a fost la nivelul canal anal (41,6%) (Figura 4 și Figura 5), urmată de intestinului subțire (33%) (Figura și Figura ), două cazuri cu localizare colo-rectală (16%) și un caz la nivelul apendicelui. Macroscopic leziunile pot îmbrăca diferite forme: noduli pigmentați, excrescențe ale mucoasei cu centrul ulcerat (majoritatea nepigmentate) sau mase tumorale cu grade variabile de necroză și pigmentare brună. Microscopic, am observat arhitectură nodulară (n=12). Majoritatea leziunilor a avut un pattern epitelioid (75%), iar altele (25%) prezentându-se ca proliferare mixtă, epitelioidă și fuziformă. Jumătate din cazuri (58,3%) nu a prezentat pigment melanic.

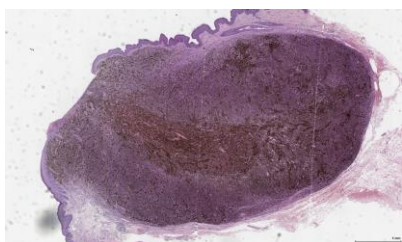


Figura 4 Melanom perianal. Masa tumorală nodulară, hiperpigmentată, infiltrativă, HE, 10x

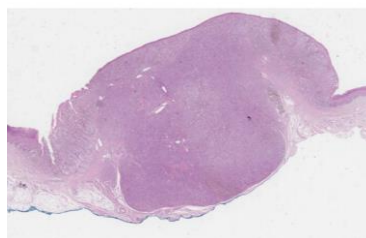


Figura 5 Melanom localizat în canalul anal, HE, 0,5x

Ulcerația (41,7%) și infiltratul inflamator (66,7%) au completat tabloul histopatologic agravând prognosticul. La testarea IHC acestea exprimă markerii caracteristici: MITF, VIM, HMB 45 și S 100 s-a regăsit în toate cazurile, iar pentru Melan A au fost pozitive 91,7% din

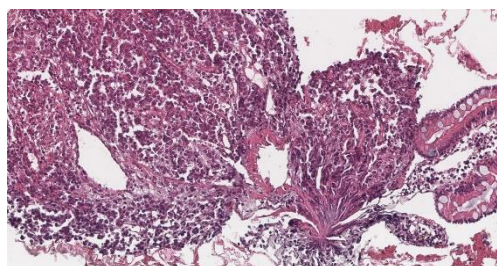


Figura 6 Melanom intestin subțire, HE, 200x

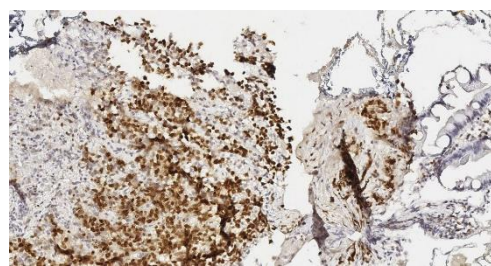


Figura 7 Melanom intestin subțire, expresie MITF, 20x

cazuri.

Am identificat un singur caz *Nras* pozitiv, respectiv 3 cazuri *Braf* pozitive, în timp ce mutația *C-kit* a fost exprimată în 4 cazuri. Mutația *Braf* a fost prezentă în 3 cazuri din cele 4

considerate metastatice. Frecvența crescută a mutației Braf în cadrul melanoamelor cutanate primare poate fi folosită drept criteriu de orientare în stabilirea sediului primar în situația unei prezentări a leziunii la nivelul mucoaselor.

### **Studiul 2.2. Investigarea statusului mutațional în melanoamele metastatice coroborat cu profilul IHC**

Melanomul este considerat o tumoră malignă agresivă cu pierderea frecventă a markerilor de diferențiere și ținând cont de faptul că tumorile cu sediu primar necunoscut reprezintă până la 5% din toate cazurile de cancer, o decizie diagnostică exactă este crucială. În cadrul acestui studiu am urmărit procesul de gestionare al tumorilor nediferențiate cu sediu primar necunoscut și evaluarea trăsăturilor esențiale pentru un diagnostic diferențial cu accent pe algoritmi IHC utili în diagnostic și tratament.

#### **Material și Metodă**

Am selectat 50 de cazuri de tumori maligne nediferențiate diagnosticate ca melanoame după efectuarea de teste IHC. Am analizat algoritmi testării IHC și modul în care această tehnică devine un instrument necesar în diagnosticarea proliferărilor maligne slab diferențiate, pentru cazurile selectate.

#### **Rezultate**

Majoritatea pacienților a fost reprezentată de femei (60%), cu un raport M/F = 0,54. În ceea ce privește localizarea procesului neoplazic s-au identificat: 4 cazuri cu localizare în regiunea mamară, 3 la nivel cerebral, 11 tumori situate pulmonar, 1 tumoră intestinală, 1 caz cu tumoră situată la nivelul sinusului maxilar, 4 tumori la nivelul membrelor inferioare, 18 metastaze ganglionare și 8 tumori intradermice.

Examinarea morfologică a tumorilor în colorație HE a arătat următoarele: în 46 de cazuri tumorile au prezentat proliferări celulare slab diferențiate, fără arhitectură specifică caracteristică, frecvent compuse din grupuri de celule epitelioides atipice sau, mult mai rar, proliferări mixte de celule fuziforme și celule epitelioides (n=3), cu arii de necroză, frecvente mitoze atipice și corpi apoptotici. Indicele mitotic și valoarea crescută pentru ki67 pun în evidență o stratificare pe grupe, 1/5 cazuri comportând un ki67  $\geq 25\%$ , cu indice mitotic crescut ce corespund unei minorități masculine din lotul examinat. Majoritatea cazurilor din lot (n=18) se situează în intervalul valoric 5-10% pentru indicele de proliferare ki67, fapt ce demonstrează mai degrabă o expansiune tumorală moderată.

S-au evidențiat patru cazuri de melanom cu aspecte histopatologice particulare: proliferare tumorală cu prezența de celule în „inel cu pecete”, structuri tubulare, pigmentare sau secreție de mucus.

În lotul examinat a fost aplicat algoritmul Fan Lin pentru 47 cazuri, folosind pentru primul setul de patru anticorpi: AE1/AE3; S 100; Vimentină; CD45/LCA, iar pentru cel de-al doilea: Melan A, HMB 45, MITF. Pentru cele 3 cazuri cu caracteristici morfologice sugestive pentru o origine carcinomatoasă a fost aplicat algoritmul Torino [21]. Într-un singur caz (ganglion inghinal) markerii IHC testați s-au dovedit negativi exceptând Vimentina și S 100. După excluderea unei erori preanalitice, cazul a fost confirmat ca melanom prin teste de biologie moleculară unde s-a detectat mutația *Braf*<sup>V600E</sup>.

Pentru cele 3 cazuri analizate prin aplicarea algoritmului de la Torino [21], prima serie de anticorpi a constatat în CK7/CK20 (ambii negativi), iar ulterior s-a efectuat testarea pentru PSA, Vimentină și Melan A, conform algoritmului. PSA s-a dovedit negativă. Vimentină și Melan A au fost difuz pozitive, confirmând originea melanocitară cu morfologie disuasivă.

Testarea *Braf* pozitivă a reprezentat 32% din lot, majoritar reprezentat de pacienți tineri, cu potențial de a răspunde la terapia adjuvantă. Am putut evalua expresia PD-L1 într-un număr de 40 de cazuri din 48 analizabile, cu expresie între 5 și 10% din celulele analizate.

### **Studiul 3: Analiza FISH cu 4 sonde folosind tehnica TMA în studiul comparativ melanoame versus nevi nevocelulari**

În ipoteza de lucru am luat în considerare studiul modificărilor genetice, exprimate prin IHC, corelate cu tehnici moderne de citogenetică utilizând analiza FISH cu 4 sonde, în melanoamele in situ și în cele nodulare. Identificarea unor câștiguri sau amplificări genice, corelate cu modificări ale expresiei imunofenotipice ale proteinelor oncoreglatoare, putând fi utilă atât ca instrument complementar în diagnosticul diferențial nev/melanom dar și contribui la subclasificarea tumorală și prognostică. Am stabilit următoarele obiective:

1. Revizuirea unei serii de neoplasme melanocitare, incluzând melanoame de tip nodular și in situ comparativ cu nevi nevocelulari în funcție de caracteristicile clinico-patologice;
2. Observarea de corelații statistice în neoplasmele melanocitare benigne versus cele maligne, prin studierea expresiei proteinelor ciclului celular (ki67, p53, p16, ciclin D1) și expresia de gene mutante cum ar fi *Braf* și *Tp53* prin tehnici de IHC;
3. Determinarea sensibilității și specificității FISH pentru studiul genelor *reeb1* (6p25), *cen6* (centromere 6), *myb* (6q23) și *ccnd1* (11q13) în diagnosticul diferențial al neoplasmelor melanocitare benigne și maligne utilizând sisteme de evaluare specifice metodei FISH cu patru sonde Vysis-Abott;
4. Corelarea profilului IHC cu anomaliile genetice observate prin tehnici de hibridizare.

## Material și metodă

Au fost selectate un număr 24 cazuri: 18 melanoame și 6 nevi nevoceulari considerați ca lot de referință. Acestea au fost eșantionate pentru construcția de blocuri TMA cu 12 cazuri/bloc. S-au efectuat teste IHC (ki-67, *CCND1*, p16, p53, *Braf* și PD-L1). Testarea FISH am efectuat-o folosind setul de sonde în 4 culori *Melanoma FISH Probe Kit - Vysis/Abbott*. Sondele au cuprins: RREB1 (6p25), CEN6 (centromer 6, MYB (6q23) și *CCND1* (11q13). După finalizarea procesului tehnic lamele au fost scanate integral și s-a evaluat manual și automatizat procentul de celule pozitive.

## Rezultate

### *Constatări clinice*

În cazul melanoamelor, media de vârstă a fost de 70 de ani (70,22 ani). Dimensiunile medii au fost de 20 mm (20,41 mm). Nevii studiați prezintă dimensiuni medii de aproximativ 7 mm (7,16 mm), iar pacienții au vârstă medie de 66 ani (66,33 ani). Clasificarea histopatologică a arătat următoarele: 10 melanoame nodulare, 7 melanoame extensive în suprafață și un melanom acral. Cei 6 nevi au fost de tip compus și intradermici, papilomatoși.

### *Rezultatele analizei IHC*

În lotul analizat majoritatea leziunilor au fost pozitive pentru Melan A (Figura 8), HMB 45 și S 100. În cazul HMB 45 am constatat modele diferite de imunomarcaj, expresia HMB 45 s-a pierdut în componenta dermică a nevilor și a fost pozitivă în componenta dermică a majorității melanoamelor. Majoritatea melanoamelor testate au arătat o pierdere a expresiei pentru p16 (77%), în schimb, în lotul de nevi expresia p16 a fost păstrată în totalitate (100%) (Figura 9).



Figura 6 Marcaj Melan A, bloc TMA I, 5x

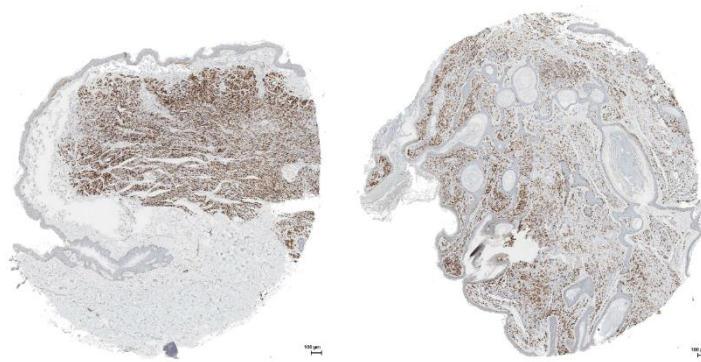


Figura 7 Bloc TMA1, marcaj p16 în 2 eșantioane de nevi, 2,5x

Am analizat perechi de contingența pentru nev și melanom cu fiecare parametru IHC studiat precum și pentru asocierea între pozitivitatea pentru markerii mutaționali și rezultatul analizei FISH.

Din calculul statistic pentru gradul de asociere între diagnostic (nev; melanom) și nivelul ki67, rezultă că pentru lotul studiat, ki67 este mai mare sau egal cu 10% pentru melanoame iar pentru nevi mai mic sau egal cu 1%.

Supraexpresia și mutația CiclinD1 apare mai frecvent în melanom (77%) (Figura 10).

Există asociere semnificativă statistic între expresia Braf și grupa de diagnostic astfel: Braf negativ în cazul nevilor, iar în cazul melanoamelor 8 cazuri pozitive (44%) (Figura 11).

Mutația p53, se regăsește în cazul a două melanoame, restul lotului fiind de tip „wild-type”.

Există o corelație statistic semnificativă între expresia p16 și diagnosticul histopatologic al leziunilor, p16 fiind pozitiv în cazul nevilor și negativ în cazul majorității melanoamelor.

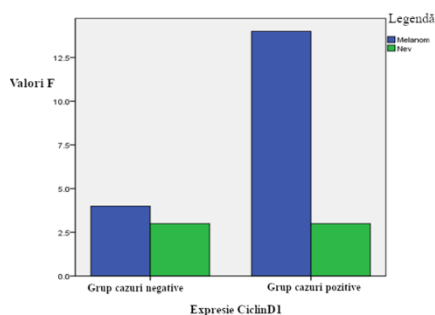


Figura 9 Analiza corelației între diagnostic și expresia CiclinD1

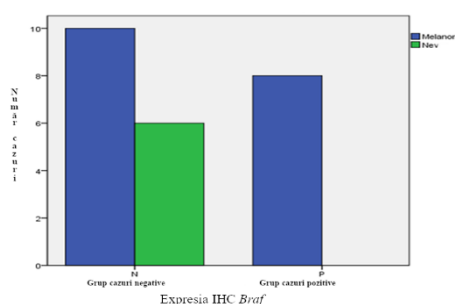


Figura 8 Expresia Braf în funcție de diagnostic

### Rezultatele investigațiilor FISH

Numărătoarea semnalelor FISH am efectuat-o pe 30 de nuclei/caz, folosind evaluarea automată conform celor 3 metode. FISH a putut fi evaluat în 23 din cele 24 cazuri (18 melanoame și 6 nevi) (Figura 12). Un singur caz a fost non-analizabil (posibil datorită unui tratament de decalcifiere).

În cazul melanoamelor evaluate prin cele 3 metode a rezultat: 11 pozitive și 6 negative. Un caz s-a calificat ca pozitiv la aplicarea criteriilor de evaluare din setul 1 și setul 2, dar pentru setul 3 a avut rezultat negativ. Numărul de criterii îndeplinite a variat de la 1 până la 4 (într-un singur caz). Analiza statistică a arătat ca factorii histoprognostici sunt independenți de numărul de mutații, iar asocierea între vârstă, dimensiunea tumorii și rezultatul analizei FISH este fără semnificație statistică. Rezultatele statistic semnificative au fost, după cum urmează:

Analiza de corelații între grupul diagnostic, expresia ki67 și prezența mutației Braf

Din cele 18 cazuri de melanom, în 8 cazuri s-a întâlnit mutația Braf, iar în celelalte 10 cazuri mutația fiind absentă, iar nevi analizați, au fost toți negativi Braf.



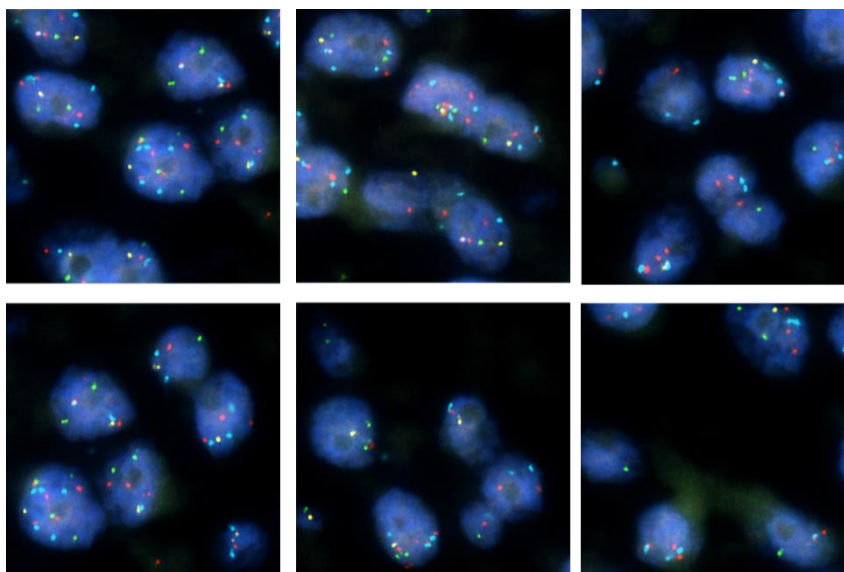


Figura 10 Rezultate analizei FISH cu amplificări de semnal corelat cu diagnosticul histopatologic

Comparând mediile valorilor ki67 a rezultat că în melanoamele pozitive la mutația Braf media expresiei imunohistochimice a proteinei ki67 este mai mică (16,87%) comparativ cu melanoamele negative la testarea Braf (24,5%).

Testul ANOVA arată că asocierea studiată este semnificativă statistic cu o valoare  $p < 0,05$  ( $p = 0,0001$ ), pentru asocierea între ki67 și grupa de diagnostic, similar datelor prezentate mai sus, însă fără asociere statistic semnificativă pentru asocierea cu prezența mutației Braf și ki67 crescut.

Analiza de corelații între grupul diagnostic, expresia ki67 și prezența mutației Tp53 relevă: Din cele 18 cazuri de melanom în 2 cazuri s-a întâlnit mutația Tp53 prin testare IHC a expresiei proteinei p53, iar nevii analizați, au fost toți negativi. Comparând mediile valorilor ki67 a rezultat că în cele două cazuri Tp53 pozitive, expresia ki67 a fost crescută.

Astfel, media valorilor ki67 în cazurile de melanom pozitive la mutația Tp53 a fost 27,5%, iar în cele 16 cazuri negative a fost mai redusă, cu o valoare de 20,3%.

S-a efectuat testul ANOVA și valoarea rezultată a fost  $p < 0,0001$ , rezultând o diferență semnificativă statistic între grupuri.

Analiza de corelații între grupul diagnostic, expresia p16 și prezența mutației Tp53: ambele cazuri de melanom pozitive p53 au fost negative pentru expresia p16. Toți nevii au fost negativi la p53, respectiv pozitivi p16. În urma calculelor folosind testul Pearson  $\chi^2$  rezultă că există o corelație semnificativă statistic între parametrii analizați, valoarea lui  $p < 0,05$ . Asocierea este semnificativă între cazurile de melanom și nev, similar asocierii dintre ki67 și p53.



## Concluzii și contribuții personale

### Concluzii rezultate din obiectivele de cercetare și perspective

I.În cadrul *primului studiu*, de evaluare a măsurătorilor digitale în investigarea melanomului cutanat, am concluzionat că obiectivele *au fost atinse în totalitate și* am demonstrat în cadrul cercetărilor următoarele:

1. Markerii IHC de linie melanocitară studiați (Sox 10 și Melan A) au performanțe similare în a stabili profunzimea maximă a invaziei tumorale;
2. Metodele digitale utilizate în măsurarea parametrilor histopatologici au reproductibilitate și acuratețe crescute;
3. Stadializarea melanoamelor cutanate utilizând tehnici digitale este valoroasă în stadiile incipiente ale bolii (pT1, pT2);
4. Metodele de analiză digitală sunt eficiente în stabilirea zonei optime de măsurare a datelor de histoprognoză;
5. Verificarea acurateții și preciziei măsurătorilor efectuate în format digital este necesară la darea în uzul clinic al fiecărui echipament, cu repetarea verificărilor la fiecare reinstalare.

II.*Studiul al doilea* de evaluare al profilului IHC al melanoamelor cu localizări neobișnuite și distincția lor de metastaze ale melanomului cutanat a avut obiectivele *atinse în totalitate și* am evidențiat următoarele concluzii:

6. Am pus în evidență caracterele histomorfologice particulare ale acestei neoplazii din punct de vedere al profilului histopatologic și IHC;
7. Rolul major al IHC în diagnosticarea leziunilor melanocitare este de a confirma natura melanocitică a tumorii și de a exclude alte tumori non-melanocitare ce mimează histopatologic și IHC un melanom;
8. Am evidențiat că stabilirea unui diagnostic de certitudine de melanom primar de mucoasă depinde de analiza histopatologică, setul de teste IHC, investigațiile aprofundate de biologie moleculară (NGS/ PCR) și anamneza antecedentelor de boală corelate cu examenul clinic;
9. Numărul redus de melanoame primare de mucoasă incluse în studiu arată suplimentar că acestea reprezintă o entitate rară, mai frecvent întâlnită la nivelul tubului digestiv față de alte tipuri de mucoase;

10. Am demonstrat că utilizarea imunomarcajului MITF în revizuirea algoritmului de lucru Fan Li pentru tumori cu sediul primar necunoscut extinde specificitatea investigațiilor.

11. Am concluzionat că examinarea IHC a acestor tipuri de melanoame poate oferi secundar informații referitoare la comportamentul biologic al unei leziuni, cu referință la expresia genelor mutate: *BRAF*, *NRAS*, *C-kit* și PD-L1 - markeri de agresivitate, respectiv ținte terapeutice;

12. Examenul IHC al tumorilor maligne slab diferențiate este un test fiabil și valoros și este recomandat ca metodă standard de diagnostic, alături de corelațiile cu datele clinice, imagistice și histopatologice. În cazul melanomului, tumora trebuie confirmată de un set de teste IHC, pentru interceptare celor cu morfologie și expresii aberante (așa cum a rezultat și în cadrul lotului pe care l-am studiat, ce a inclus melanoame cu celule în „inel cu pecete” și melanoame cu formare de ”tubi”).

III. În cadrul *studiului al treilea* de evaluare a specificității testelor FISH cu 4 sonde în diagnostic și de corelare a acestora cu markeri mutaționali, obiectivele *au fost atinse în totalitate*. În prezenta lucrare, în cadrul cercetărilor:

13. Am utilizat pentru prima oară la nivel național tehnica FISH cu 4 sonde în diagnosticul leziunilor melanocitare și tot pentru prima oară la nivel național am aplicat tehnica pe blocuri de parafină TMA.

14. Am concluzionat că sensibilitatea și specificitatea FISH cu 4 sonde în diagnosticul leziunilor maligne melanocitare nodulare și extensive în suprafață este crescută și poate fi utilizată în cercetare pe țesut arhivat în blocuri de parafină

15. Prin analiză statistică am confirmat independența rolului metodei FISH cu patru sonde în diagnosticul diferențial al leziunilor melanocitare.

16. Am demonstrat că factorii histoprognoști sunt independenți de tipul mutațiilor identificabile prin IHC și respectiv de anomaliile citogenetice identificabile prin tehnica FISH cu patru sonde.

17. În urma analizei statistice am identificat prezența unei subcategorii de melanoame în care există corelații între factorii histoprognoști, markerii mutaționali evidențiable prin tehnici IHC (Ciclin D1, Braf etc) și analiza mutațională utilizând sonde FISH (REB1 /6p25; MYB /6q23; CCND1 /11q13 și CEP 6 p).

## Evidențierea contribuțiilor proprii

În cercetările efectuate am adus o contribuție personală, originală, ce se reflectă în:

1. Am demonstrat că metodele digitale utilizate în măsurarea parametrilor histopatologici ai melanomului au reproductibilitate și acuratețe crescute.
2. Am constatat că markerii IHC de linie melanocitară (Sox10 și Melan A) au performanțe similare în a stabili profunzimea maximă a invaziei tumorale.
3. Am evidențiat faptul că măsurarea parametrilor histopatologici ce caracterizează melanomul prin metode digitale este valoroasă în stadiile incipiente ale bolii (pT1, pT2).
4. Am utilizat pentru prima oară la nivel național tehnici FISH cu 4 sonde în diagnosticul leziunilor melanocitare maligne și le-am aplicat tot pentru prima oară la nivel național pe blocuri de parafină TMA.
5. Am identificat un subgrup din lotul studiat candidat pentru o subcategorie în clasificarea genomică melanomului (*p53*, *Braf* pozitiv și  $ki67 > 25\%$ ).
6. Am concluzionat că sensibilitatea și specificitatea testării FISH cu 4 sonde în diagnosticul melanoamelor extensive în suprafață și al celor nodulare este crescută și poate fi utilizată în cercetare pe țesut arhivat în parafină și în consecință, asupra biopsiilor de tip punch cu material tisular de dimensiuni reduse.

În final, doresc să precizez că evaluarea tumorilor melanocitare prin microscopie optică este dificilă și reprezintă un subiect de interes în cadrul dermatopatologiei. În acest domeniu, experiența, expertiza și consensul oferă încă cel mai înalt standard pentru un diagnostic precis. Pentru îmbunătățirea diagnosticului și prognosticului este nevoie de rafinarea tehnicilor de interpretare a histopatologiei de rutină, prin tehnici de microscopie digitală și de analiză a imaginilor histopatologice de pe lamele scanate. În acest mod se pot populariza și anticipa investigațiile histopatologice asistate de calculator. Dezvoltarea și perfecționarea tehnicilor adiționale de diagnostic cum ar fi FISH, CGH, vor integra și vor completa în mod semnificativ această tendință.

Startul medicinei la distanță într-o lume tot mai izolată a început și în domeniul anatomiei patologice. Avantajele și supraviețuirea acestor tehnici depinde însă în primul rând de considerații practice și economice, ce nu pot fi de lăsate în seama unui cercetător izolat sau a unui singur individ aflat în cumpăna diagnosticului.



## Bibliografie selectivă

1. Plan national de diagnostic precoce, tratament si monitorizare a melanomului malign [Internet]. [citat 8 iulie 2020]. Disponibil la: <http://muhaz.org/plan-national-de-diagnostic-precoce-tratament-si-monitorizare.html>
2. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer*. ianuarie 2005;41(1):45–60.
3. Clark WH, Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol*. decembrie 1984;15(12):1147–65.
4. Slominski A, Wortsman J, Carlson AJ, Matsuoka LY, Balch CM, Mihm MC. Malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med*. octombrie 2001;125(10):1295–306.
5. Weltgesundheitsorganisation ; ID: gnd/1007857-5. WHO classification of skin tumours. 4th edition. Elder DE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R, editori. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2018. 470 p. (World Health Organization classification of tumours).
6. Keung EZ, Gershenwald JE. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018;18(8):775–84.
7. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al., editori. *AJCC Cancer Staging Manual* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [citat 3 septembrie 2020]. Disponibil la: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-40618-3>
8. Compton LA, Murphy GF, Lian CG. Diagnostic Immunohistochemistry in Cutaneous Neoplasia: An Update. *Dermatopathology*. 8 aprilie 2015;2(1):15–42.
9. Puig-Butille JA, Escámez MJ, Garcia-Garcia F, Tell-Marti G, Fabra À, Martínez-Santamaría L, et al. Capturing the biological impact of CDKN2A and MC1R genes as an early predisposing event in melanoma and non melanoma skin cancer. *Oncotarget*. 16 decembrie 2013;5(6):1439–51.
10. Cheng L, Lopez-Beltran A, Massari F, MacLennan GT, Montironi R. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. *Mod Pathol*. ianuarie 2018;31(1):24–38.
11. Ferrara G, De Vanna AC. Fluorescence In Situ Hybridization for Melanoma Diagnosis: A Review and a Reappraisal. *Am J Dermatopathol*. aprilie 2016;38(4):253–69.
12. Blokx WAM, van Dijk MCRF, Ruiter DJ. Molecular cytogenetics of cutaneous melanocytic lesions - diagnostic, prognostic and therapeutic aspects. *Histopathology*. ianuarie 2010;56(1):121–32.
13. Moore DA, Pringle JH, Saldanha GS. Prognostic tissue markers in melanoma. *Histopathology*. 2012;60:679–89.
14. Gimotty PA. Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2005;23:8048–56.
15. Frahm SO, Schubert C, Parwaresch R, Rudolph P. High proliferative activity may predict early metastasis of thin melanomas. *Hum Pathol*. 2001;32:1376–81.
16. North JP. Assessment of copy number status of chromosomes 6 and 11 by FISH provides independent prognostic information in primary melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2011;35:1146–50.
17. Wen-Hui Wan, Fortuna MB, Furmanski P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. *J Immunol Methods*. octombrie 1987;103(1):121–9.
18. Ward WH, Lambreton F, Goel N, Yu JQ, Farma JM. Clinical Presentation and Staging of Melanoma. În: Ward WH, Farma JM, editori. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2017 [citat 16 iunie 2019]. Disponibil la: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK481857/>
19. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*. noiembrie 1970;172(5):902–8.
20. Riihimäki M, Hemminki A, Sundquist K, Hemminki K. Causes of death in patients with extranodal cancer of unknown primary: searching for the primary site. *BMC Cancer*. 2014;14:439.
21. Stella GM, Senetta R, Cassenti A, Ronco M, Cassoni P. Cancers of unknown primary origin: current perspectives and future therapeutic strategies. *J Transl Med*. 24 ianuarie 2012;10:12.

## Lista lucrărilor științifice publicate

### Articole publicate în reviste de specialitate

1. Digital assessment of depth of invasion în melanoma using different immunohistochemical stains; **Leila Ali**, Reza Alaghehbandan, Valentin T. Moldovan, Diana Derewicz, Anca M. Coricovac, Octav Ginghina, Maria Sajin, Mariana Costache; Archives of the Balkan Medical Union Copyright © 2020 Balkan Medical Union vol. 55, no.2, pp. 11-18; June 2020, <https://umbalk.org/2020-vol-55-issue-2-june/>
2. Metastatic melanoma presenting as undifferentiated tumour of unknown primary site: an immunohistochemical algorithm; **Leila Ali**, Valentin Moldovan, Diana Derewicz, Octav Ginghina, Maria Sajin, Mariana Costache; Archives of the Balkan Medical Union Copyright © 2019 Balkan Medical Union vol. 54, no. 4, pp. 11-18; December 2019, <https://umbalk.org/2019-vol-54-nr-4-december/>
3. Malignant Melanoma Of The Gastrointestinal Tract: An Unusual Localization; **Ali L.**, Moldovan V., Costache D., Sajin M., Pătrașcu O.M., Costache M.; Medicine in Evolution 2018, Volum XXIV, Nr. 2/2018, p 124-131, [http://medicineinevolution.umft.ro/2018\\_.htm](http://medicineinevolution.umft.ro/2018_.htm)