

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA” DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE MEDICINĂ**

**ȘCOALA DOCTORALĂ
DISCIPLINA FIZIOPATOLOGIE II**

***STUDIUL MECANISMELOR FIZIOPATOLOGICE ALE MOLECULELOR IMPLICATE
ÎN PROGRESIA MELANOMULUI***

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. DANIELA ADRIANA ION

Student-doctorand:

MIHAELA POSTOLACHE CĂS. ANTOHE

2023

CUPRINS

INTRODUCERE	1
I. PARTE GENERALĂ – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	5
1.DATE GENERALE ȘI DE IMUNOGENICITATE	5
1.1.DATE EPIDEMIOLOGICE	5
1.2.MELANOMUL - TUMORĂ IMUNOGENICĂ	6
1. 3. ROLUL RĂSPUNSULUI INFLAMATOR ÎN PROGRESIA MELANOMULUI	8
1.3.1. TILs - factor prognostic și predictiv în melanom	9
1.3.2. Micromediul tumoral și TILs	10
1.3.3. Antigenele melanomului	10
1.3.4. Celulele dendritice	11
1.3.5. Punctele de control imun	12
1.3.6. Limfocitele T	13
1.3.7. Celulele natural killer	14
1.3.8. Celulele B	15
1.3.9. Macrofagele	15
1.4. REGRESIA TUMORALĂ	17
1.4.1. Rolul sistemului imun în apariția regresiei tumorale	20
2. PROGNOSTICUL PACIENȚILOR CU MELANOM CUTANAT PRIMAR ȘI ROLUL MOLECULELOR IMPLICATE ÎN PROGRESIA MELANOMULUI ÎN STRATIFICAREA RISCULUI	23
2.1. PROGNOSTICUL PACIENȚILOR CU MELANOM CUTANAT PRIMAR	23
2.2. ROLUL MOLECULELOR IMPLICATE ÎN PROGRESIA MELANOMULUI ÎN STRATIFICAREA RISCULUI	29
II. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	37
3.IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE GENERALE ALE CERCETĂRII	37
4. METODOLOGIA GENERALĂ A CERCETĂRII	38
4.1. MATERIALE ȘI METODE	38
4.2. METODELE HISTOPATOLOGICE ȘI IMUNOHISTOCHIMICE UTILIZATE	40

4.2.2. PROTOCOL DE LUCRU COLORAȚIE HEMATOXILINĂ-EOZINĂ	41
4.2.3. PROTOCOL DE LUCRU IMUNOHISTOCHEMIE	41
4.2.4. CRITERII DE EVALUARE IMUNOHISTOCHEMICĂ	42
4.2.5. TESTE STATISTICE UTILIZATE	43
5. ANALIZA CORELAȚIILOR CLINICO-PATOLOGICE ÎN LOTUL DE MELANOAME CUTANATE	44
5.1. REZULTATE	44
5.1.1. PARAMETRI GENERALI	44
5.1.2. LOCALIZAREA TUMORII	46
5.1.3. SUBTIPUL TUMORAL	47
5.1.4. MODALITATEA DE APARIȚIE A TUMORII PRIMARE	47
5.1.5. DISCUȚII	48
5.1.6. PARAMETRI HISTOPATOLOGICI CLASICI	49
5.1.6.1. INDICELE CLARK	49
5.1.6.2. INDICELE BRESLOW	52
5.1.6.3. ULCERAȚIA	55
5.1.6.4. INDICELE MITOTIC	58
5.1.6.5. REGRESIA TUMORALĂ	62
5.1.6.7. INFILTRATUL INFLAMATOR	67
5.1.6.8. DISCUȚII	72
6. CARACTERIZAREA IMUNOHISTOCHEMICĂ A LOTULUI DE MELANOAME	78
6.1. ANALIZA CORELAȚIILOR ÎNTRE PARAMETRII CLINICO-PATOLOGICI SI EXPRESIILE IMUNOHISTOCHEMICE	78
6.1.1. ANALIZA EXPRESIEI CD1A	78
6.1.1.1. DISCUȚII	82
6.1.2. ANALIZA EXPRESIEI FOXP3	82
6.1.2.1. DISCUȚII	86
6.1.3. ANALIZA EXPRESIEI CD4	87
6.1.3.1. DISCUȚII	90
6.1.4. ANALIZA EXPRESIEI CD8	91
6.1.4.1. DISCUȚII	93
6.1.5. ANALIZA EXPRESIEI CD3	94

6.1.5.1. DISCUȚII	97
6.1.6. ANALIZA EXPRESIEI CD20	98
6.1.6.1. DISCUȚII	101
6.1.7. ANALIZA EXPRESIEI CD11C	102
6.1.7.1. DISCUȚII	105
6.1.8. ANALIZA EXPRESIEI CEACAM1	106
6.1.8.1. DISCUȚII	113
6.2. ANALIZA CORELAȚIILOR ÎNTRE EXPRESIILE IMUNOHISTOCHEMICE ALE MELANOAMELOR STUDIAȚE	115
6.2.1. DISCUȚII	128
7. ANALIZA CORELAȚIILOR CLINICO-PATOLOGICE ÎN LOTUL CONTROL (NEVI) ȘI ANALIZA COMPARATIVĂ DINTRE CELE DOUĂ LOTURI STUDIAȚE	132
7.1. ANALIZA EXPRESIEI FOXP3	133
7.2. ANALIZA EXPRESIEI CD4	133
7.3. ANALIZA EXPRESIEI CD8	135
7.4. ANALIZA EXPRESIEI CD3	136
7.5. ANALIZA EXPRESIEI CD20	137
7.6. ANALIZA EXPRESIEI CD11C	138
7.7. ANALIZA EXPRESIEI CEACAM1	139
7.8. DISCUȚII	141
8. CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	145
BIBLIOGRAFIE	152
LISTĂ FIGURI	168
ANEXE	172

I. PARTE GENERALĂ – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Melanomul reprezintă cea mai severă formă de cancer de piele. Ocupă locul cinci ca frecvență în rândul cancerelor în Statele Unite ale Americii, atât în rândul bărbaților cât și în rândul femeilor, înregistrând o incidență crescută odată cu înaintarea în vârstă. [1] Supraviețuirea pacienților cu melanom depinde de momentul diagnosticării bolii iar depistarea precoce este esențială pentru un prognostic bun și o rată de supraviețuire excelentă. Incidența melanomului a crescut foarte mult în ultimii ani peste tot în lume iar mortalitatea a început să scadă, probabil datorită eforturilor susținute de detectare precoce și a progreselor importante obținute în tratamentul melanoamelor aflate în stadii avansate.

Melanomul este considerat o boală multifactorială și apare ca urmare a interacțiunii dintre predispoziția genetică și expunerea la factorii de mediu. Melanomul extensiv în suprafață este cea mai frecventă formă de melanom și reprezintă 70% din toate cazurile, determinând 25% din totalul deceselor cauzate de această boală [5]. 5% dintre pacienții cu acest subtip de melanom prezintă risc de metastazare și chiar deces în decurs de 10 ani [6]. Rata globală de supraviețuire la 10 ani este de aproximativ 4,5-8%. [7]–[9] Din fericire, în majoritatea cazurilor de melanoame cutanate subțiri, excizia chirurgicală este curativă iar pacienții au un prognostic general favorabil. Astfel, pentru melanoamele aflate în stadiul T1a, supraviețuirea la 10 ani este de 98%. [10] Prin urmare, identificarea factorilor predictivi puternici pentru metastazare și supraviețuire este obligatorie, în special pentru pacienții cu melanoame subțiri.

În prezent, diagnosticul, prognosticul și tratamentul pacienților cu melanom se bazează pe sistemul de stadializare al tumorilor maligne TNM (*T – tumor, N – node, M – distant metastasis*) care ia în considerare factorii de risc clinico-patologici: grosimea tumorii, ulcerația, rata mitotică, statusul ganglionului sentinelă și prezența metastazelor [11]. Dar clasificarea Comitetului Unit American pentru Cancer (AJCC - *American Joint Committee on Cancer*) nu poate prezice evoluția distinctă și răspunsurile diferite la tratamentul melanoamelor clasificate în aceeași etapă. Astfel este necesară identificarea cât mai rapidă de noi parametri pentru o stratificare cât mai bună și pentru stabilirea tratamentului optim pentru fiecare pacient, conform riscului său particular.

Melanomul este considerat de mulți ani o tumoră imunogenică și se încearcă utilizarea acestei particularități în dezvoltarea unor noi strategii terapeutice. Imunogenicitatea unei tumori reprezintă capacitatea acesteia de a induce răspunsuri ale sistemului imun adaptativ ce pot contracara creșterea și progresia celulelor maligne.[12], [13] Melanomul reprezintă una dintre cele mai imunogenice tumori iar interacțiunea acestuia cu sistemul imun este încă în curs de cercetare. Se pare că imunogenicitatea melanomului depinde de interacțiunea dintre celulele tumorale și celulele imune, precum și de factorii eliberați de celulele canceroase în micromediul tumoral. [14] Un pas important în înțelegerea imunobiologiei tumorale este analiza populațiilor și a subseturilor de celule imune care formează infiltratul limfocitar asociat tumorii (TILs). TILs constituie un grup polimorf care este compus în principal din limfocite T efectoare, limfocite T reglatorii, celule natural killer (NK), celule dendritice și macrofage [15]. Distribuția, densitatea, profilul și starea de activare a celulelor care constituie TILs pot varia și pot modifica evoluția clinică.

Regresia histologică este considerată în ultimii ani un fenomen imun cu valoare prognostică pozitivă în cazul pacienților cu melanom cutanat primar. Mulți ani a fost însă interpretată ca fiind un factor de prognostic negativ. Aceasta reprezintă, alături de infiltratul tumoral limfocitar, un semn precoce al activării sistemului imun al gazdei împotriva celulelor tumorale. [16] Nu s-a ajuns încă la o concluzie clară privind semnificația prognostică a fenomenului de regresie în melanom. Imunoterapia în cazul melanomelor diagnosticate în stadii avansate a arătat în ultimii ani rezultate promițătoare, astfel, o înțelegere mai bună a interacțiunii dintre celulele tumorale și celulele sistemului imun ar putea avea rezultate benefice în cazul tratamentului acestor pacienți. [16] În majoritatea studiilor care au arătat prognostic bun în cazul melanoamelor cu regresie au predominat melanoamele subțiri, cu indice Breslow sub 1 mm, acestea având oricum un prognostic mai bun față de melanoamele groase. [17]–[19] În studiile în care s-au inclus melanoame cu indice Breslow peste 1 mm, de cele mai multe ori nu s-a găsit o asociere între prezența regresiei și supraviețuirea pacienților. [20], [21]

II. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

3. IPOTEZA DE LUCRU ȘI OBIECTIVELE GENERALE ALE CERCETĂRII

Studiul de față are ca scop principal evaluarea completă și amănunțită a mecanismelor fiziopatologice ale progresiei tumorale și identificarea de noi factori de prognostic în melanomul cutanat primar. Având în vedere că incidența melanomului se află într-o continuă creștere iar supraviețuirea pacienților este dependentă de momentul diagnosticării bolii, depistarea precoce este esențială pentru un prognostic bun și o rată de supraviețuire excelentă. Identificarea și înțelegerea mecanismelor fiziopatologice ce au loc la nivel molecular și a interacțiunilor dintre acestea ne pot furniza informații prețioase în ceea ce privește inițierea și progresia tumorală dar și despre prognosticul pacienților cu melanom.

Am evaluat astfel melanoame cutanate și nevi comuni cu ajutorul metodelor histopatologice convenționale dar și prin metode moderne, precum imunohistochimia, corelând rezultatele obținute cu cele mai relevante date din literatura de specialitate. Am analizat date demografice, clinice, parametri histopatologici deja consacrați pentru rolul prognostic, markeri imunohistochimici și am urmărit depistarea de noi ținte prognostice și terapeutice.

Pentru realizarea scopului propus în acest studiu am avut în vedere îndeplinirea mai multor obiective:

- Descrierea celor mai relevante aspecte legate de datele demografice și clinice ale loturilor analizate cu scopul identificării factorilor de risc implicați în patogeneza melanomului;
- Lărgirea ariei de cunoaștere privind aspectele histopatologice și imunohistochimice ale melanomului cutanat în scopul identificării celor mai importanți markeri de evoluție și prognostic;
- Realizarea de comparații și corelații între markerii de prognostic consacrați și a celor imunohistochimici studiați în scopul identificării de noi asocieri ce ar putea ajuta la înțelegerea evoluției leziunilor de melanom și la identificarea de posibile ținte terapeutice.

4. METODOLOGIA GENERALĂ A CERCETĂRII

4.1. MATERIALE ȘI METODE

Am realizat un studiu retrospectiv de tip caz-control în care am analizat factorii de prognostic clinici, histopatologici și imunohistochimici pentru melanoame cutanate primare și nevi. Lotul de studiu a cuprins în final 70 probe, împărțite astfel: 56 melanoame cutanate extensive în suprafață, dintre care 30 melanoame cu regresie și 26 melanoame fără regresie și 14 nevi comuni. Leziunile au fost de la pacienți fără istoric de tumori cutanate maligne. Cazurile incluse în studiu fac parte din arhiva Serviciului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Colentina, fiind diagnosticate în perioada 2012-2016 și au fost selectate în cadrul proiectului de cercetare CNCS-UEFISCDI, PN-III-P4-ID-PCE-2016-0641, crt nr 183/2017, în cadrul PNCDI III, Proiect finanțat de către Ministerul Cercetării și Inovării, cu titlul “*Caracterizarea mecanismelor ce implică CEACAMI în melanom pe baza studiului regresiei tumorale, o abordare inovatoare pentru optimizarea managementului pacienților cu melanom subțire*” – CEACAMMEL. Studiul a fost aprobat de Comisia de Etică a Cercetării Științifice a Spitalului Clinic Colentina, București. (Anexa 2)

Criteriile de includere utilizate pentru selecția cazurilor au fost:

- prezența confirmată histopatologic a leziunilor de melanom cutanat extensiv în suprafață;
- prezența confirmată histopatologic a leziunilor de nevi comuni;
- probă prelevată tip rezecție integrală pentru toate cazurile.

Criterii de excludere folosite pentru selecția cazurilor:

- leziunile de la nivelul mucoaselor și tegumentelor de la nivelul mâinilor și picioarelor;
- cazurile cu probă prelevată prin biopsie de tip punch;
- leziunile provenite de la același pacient;
- leziuni de melanom de tip nodular

Pentru realizarea de colorații imunohistochimice a fost necesară efectuarea de blocuri multitisulare. După selecția cazurilor am extras lamele corespunzătoare acestora din histoteca Serviciului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Colentina. Astfel, țesuturile fixate în formol și încorporate în parafină au fost analizate ulterior la microscopul optic. După încercuirea și decuparea de fragmente tisulare cu aspecte histopatologice caracteristice tumorilor analizate s-au realizat blocuri multitisulare. Deși inițial am selectat 68 leziuni de melanom cutanat și 22 leziuni

de nevi comuni, am exclus apoi din studiu cazurile cu fragmente tisulare subțiri. Au fost păstrate doar cazurile pentru care decuparea de fragmente tisulare nu va împiedica rediagnosticarea ulterioară. Țesuturile care au rămas după decupare și nu au fost incluse în blocurile multitisulare sunt păstrate în histoteca spitalului conform normelor în vigoare. Blocurile multitisulare au fost ulterior secționare iar fiecare secțiune a fost așezată pe o lamă tratată anterior pentru teste imunohistochimice.

După parcurgerea acestor etape, lotul final de studiu cuprinde un total de 70 probe, dintre care 30 leziuni de melanom cutanat cu regresie și 26 leziuni de melanom cutanat fără regresie și 14 leziuni de nevi comuni. Blocurile multitisulare obținute au fost ulterior colorate cu markeri imunohistochimici pentru:

- Analiza expresiei celulelor Langerhans: CD1a;
- Analiza celulelor din micromediul inflamator tumoral: CD3, CD4, CD8, CD20, CD11c, FoxP3;

Pentru limfocitele T conveționale au fost folosiți markerii imunohistochimici CD3, CD4 și CD8, pentru limfocitele B markerul CD20, iar pentru limfocitele T reglatorii (Tregs), markerul FoxP3.

- Analiza moleculei de adeziune și invazivitate CEACAM1.

Am studiat expresia acestora în cadrul fiecărui lot, prin realizarea de corelații cu factori de prognostic histopatologici clasici. În plus, am efectuat analiza comparativă între cele trei tipuri de probe prelevate.

Am selectat și analizat date din buletinele histopatologice, după cum urmează:

- Pentru loturile de melanoame:
 1. Parametri generali: sex, vârstă, localizarea leziunii;
 2. Parametri legați de aspectul macroscopic al leziunii: prezența sau absența ulcerăției macroscopice
 3. Parametri histologici ai leziunii: nivelul de invazie în profunzime a tumorii, evaluarea mitozelor atipice, prezența invaziei perivasculare și/sau perineurale
 4. Parametri ce caracterizează infiltratul inflamator
- Pentru lotul de nevi
 1. Parametri generali: sex, vârstă, localizarea leziunii;
 2. Parametri histologici ai leziunii

Analiza histopatologică a probelor a fost realizată în cadrul laboratorului Serviciului de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Colentina din București. Piesele au fost orientate macroscopic conform protocoalelor în vigoare ale specialității Anatomie Patologică, emise de Ministerul Sănătății al României și publicate în Monitorul Oficial nr.723 din 29 octombrie 2010.

4.2.5. TESTE STATISTICE UTILIZATE

Analiza statistică a fost efectuată folosind programul IBM SPSS Statistics 21. Testele statistice folosite în analiză au fost:

- **Testul Chi-Pătrat** - este folosit pentru a verifica dacă două variabile nominale / dihotomice sunt asociate. Coeficientul de corelație *Phi* este utilizat pentru identificarea asocierilor existente între două variabile dihotomice. Ia valori în intervalul de la -1 la 1. Direcția asocierii este dată de semn. Coeficientul de corelație *V* a lui Cramer măsoară tăria asocierii dintre variabile și ia valori între 0 și +1.
- **Testul Mann – Whitney U** - test neparametric folosit pentru a determina dacă există diferențe între două grupuri independente atunci când variabila dependentă este fie ordinală, fie continuă, însă neavând o distribuție normală.
- **Testul Kruskal – Wallis H** - test neparametric al rangurilor folosit pentru a determina dacă există diferențe semnificative statistice între două sau mai multe grupuri independente, atunci când variabila dependentă este continuă sau ordinală.

5. ANALIZA CORELAȚIILOR CLINICO-PATOLOGICE ÎN LOTUL DE MELANOAME CUTANATE – REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pacienții din lotul de melanoame au fost distribuiți în mod echilibrat din punct de vedere al sexului, acesta fiind constituit din 51.8% femei și 48.2% bărbați. Vârstele pacienților au fost cuprinse între 31 și 87 de ani, vârsta medie fiind de 57.29 ani. Vârsta medie a pacienților de sex feminin a fost puțin mai mare (58 ani) față de cea a pacienților de sex masculin (56.52 ani). Distribuția pacienților în funcție de decada de vârstă a fost uniformă, doar 7.1% (4) au prezentat vârste peste 80 ani. Mai mult de jumătate (51.72%) dintre pacienții de sex feminin cu melanom au prezentat vârste cuprinse între 41 și 60 ani. În schimb, în cazul bărbaților, decadele de vârstă 31 – 40 ani (33.3%), respectiv 61 – 70 ani (22.2%) au înregistrat cele mai multe melanoame cutanate. Abia după vârsta de 70 ani distribuția melanoamelor în funcție de sex a fost similară.

În ceea ce privește localizarea tumorilor, cele mai multe au fost situate la nivelul trunchiului, 32% dintre tumori fiind înregistrate la nivelul feței posterioare și 30% la nivelul feței anterioare a trunchiului. Acestea au fost urmate de membrele inferioare, membrele superioare și regiunea cap-gât. În rândul bărbaților, majoritatea tumorilor au fost localizate la nivelul feței posterioare a trunchiului (48%) și respectiv la nivelul feței anterioare a trunchiului (24%). În cazul femeilor, majoritatea tumorilor au fost localizate la nivelul feței anterioare a trunchiului (36%) și respectiv la nivelul membrelor inferioare (32%). Aceste observații concordă cu literatura. Astfel, într-un studiu extins realizat în Suedia pe 12.533 pacienți a reieșit faptul că femeile au prezentat în 53,5% din cazuri melanoame la nivelul extremităților și 30,2% la nivelul trunchiului, în timp ce bărbații au avut 25,2% la nivelul extremităților și 56,7% la nivelul trunchiului [198].

Distribuția cazurilor din lotul de melanoame studiat în funcție de nivelul de invazie Clark a fost relativ uniformă, 48.2% dintre cazurile de melanoame având nivelul Clark între I și III și 51.8% nivel IV-V. În rândul bărbaților au predominat indicii Clark IV-V (62.96%, 17 pacienți) iar în cazul femeilor situația a fost relativ echilibrată, înregistrându-se indicii Clark între I și III la 58.62% dintre pacienți și IV-V la 41.38%. Vârsta medie a pacienților cu indice Clark IV-V (62.93 ani) a fost mai mare decât cea a pacienților cu nivel Clark între I și III (51.21 ani). Exceptând decada 41 – 50 ani, am observat o creștere susținută a incidenței nivelurilor IV-V de invazie Clark în defavoarea nivelurilor I-III, odată cu creșterea vârstei pacienților de la o decadă la alta. *Testul Mann-Whitney U* a relevat diferențe semnificative statistic între vârsta pacienților cu indice Clark

I-III (rang mediu 22.24) și vârsta pacienților cu indice Clark IV-V (rang mediu 34.33, $U=222.500$, $Z=-2.773$, $p=0.006$). Vârsta înaintată este cunoscută ca fiind factor de prognostic slab pentru pacienții pentru melanom. Multe studii au indicat o corelație inversă între profunzimea invaziei tumorale și supraviețuirea pacientului iar corelația nivelului Clark cu acest parametru concordă cu datele din literatură. [195], [212], [213].

În ceea ce privește grosimea tumorală Breslow, au predominat tumorile cu indice Breslow între 0.25 – 0.49mm (28.6%), urmate de cele cu valori între 1 și 1.9 mm (21.4%). În plus, se remarcă o pondere mai mare a valorilor indicelui Breslow între 1 și 1.9 mm în rândul bărbaților (29.63%) iar în rândul femeilor între 0.25 și 0.49 mm (27.59%). Dacă vorbim de vârsta medie a pacienților în funcție de grosimea tumorală Breslow, am observat că aceasta este mai scăzută în cazul pacienților cu valorile Breslow de 0.25 – 0.49 mm, aceasta fiind de 48.50 ani (deviația standard 13.13; CI: [41.5; 55.5]) și mai crescută în cazul pacienților cu indice Breslow ≥ 2 mm, și anume 66.2 ani (deviația standard 13.73; CI: [56.38; 76.02]). Aceste date concordă cu cele din literatura de specialitate, cunoscându-se faptul că vârsta înaintată și grosimea tumorală crescută sunt factori de prognostic negativ.

Prezența ulcerăției a fost întâlnită la 21.4% dintre pacienți, având o distribuție uniformă în funcție de sex, astfel că prezintă ulcerăție 22.22% dintre pacienții de sex masculin respectiv 20.69% dintre pacienții de sex feminin. Pacienții a căror tumori au prezentat ulcerăție au avut vârste cuprinse între 37 și 84 ani, cu o vârstă medie de 64 ani, mai mare față de cea a pacienților fără ulcerăție, aceștia având vârsta medie de 55.45 ani.

Toate melanoamele cu indice mitotic > 5 mitoze/mm² au asociat un indice Clark de IV sau V, pe când în cazul tumorilor cu indice mitotic de 0-5 mitoze/mm², 57.78% dintre acestea au avut indice Clark între I și III și 42.22% indice Clark de IV-V. Aceste diferențe între distribuții au fost confirmate ca fiind semnificative statistic prin aplicarea *testului Chi – pătrat* ($\chi^2=9.073$, $p=0.011$) iar coeficienții Phi și V al lui Cramer (0.414) au relevă o legătură între cele două variabile ($p=0.011$). Numeroase studii au arătat valoarea prognostică a ratei mitotice la pacienții cu melanom cutanat. Mai multe cercetări au demonstrat că rata mitotică are o valoare prognostică independentă și, de asemenea, este cel mai important factor de prognostic pentru supraviețuire după indicele Breslow [5], [191], [220]. Barnhill și colaboratorii au arătat că un indice mitotic de 1-6 mitoze / mm² crește riscul de mortalitate la 5 ani de 8 ori, în timp ce o rată mitotică mai mare de 6 mitoze / mm² crește mortalitatea la 5 ani de 11 ori [221].

6. CARACTERIZAREA IMUNOHISTOCHEMICĂ A LOTULUI DE MELANOAME – REZULTATE ȘI DISCUȚII

Distribuția cazurilor în funcție de expresia CD1a a fost astfel: 16.7% din cazuri au avut expresia CD1a negativă, 50% din cazuri CD1a rare, 33.3% din cazuri au avut CD1a frecvente.

Fără a marca o diferență semnificativă statistic, se observă că tumorile cu indice Breslow mai mic tind să aibă mai des expresia CD1a negativă, pe când cele cu indice Breslow mai crescut tind să aibă mai des CD1a frecvente. Totodată se remarcă o creștere a incidenței indicelui Clark IV-V pe măsura creșterii în intensitate a expresiei CD1a. În plus, am obținut o asociere semnificativă statistic între expresia CD1a și nivelul Clark (*testul Chi-pătrat*, $\chi^2=6.964$, $p=0.031$), iar coeficienții Phi și V al lui Cramer (0.482) relevă o legătură puternică între cele două variabile ($p=0.031$).

În ceea ce privește prezența ulcerăției, se remarcă o creștere semnificativă a incidenței acesteia în cazul tumorilor care au prezentat CD1a frecvente (60%) în comparație cu tumorile care au avut expresia CD1a negativă (20%) sau rară (13.3%). Mai mult decât atât, am obținut o asociere semnificativă statistic între expresia CD1a și prezența ulcerăției (*testul Chi – pătrat*, $\chi^2=6.508$, $p=0.039$). Coeficienții Phi și V al lui Cramer (0.466) au arătat o legătură puternică între cele două variabile ($p=0.039$). Astfel, tumorile cu CD1a frecvente prezintă semnificativ mai des ulcerăție comparativ cu tumorile care au o altă expresie a CD1a (negativ, rare).

Dacă ne referim la indicele mitotic, nu se remarcă o asociere semnificativă statistic între acesta și expresia CD1a dar se observă o creștere ușoară a indicelui mitotic pe măsură ce se intensifică nivelul expresiei CD1a. În lotul de melanoame studiat incidența regresiei tumorale a fost de 80% în grupul de tumori cu CD1a negativ și în grupul cu CD1a frecvente, respectiv de 60% în grupul de tumori cu CD1a rare.

Expresia FoxP3 este mai frecventă în cazul tumorilor cu indice Breslow între 0.75-0.99 mm (33.33%) și a celor cu grosimea tumorală peste 2 mm (33.33%), fără a exista o asociere semnificativă statistic între cei doi parametri. ($p=0.401$) În ceea ce privește ulcerăția, se remarcă faptul că prezența acesteia urmează o tendință similară la pacienții cu expresie FoxP3 negativă sau rară, având o incidență de aproximativ 16%, pe când în cazul pacienților cu expresii FoxP3 frecvente, incidența ulcerăției este mult mai crescută (57.14%). *Testul Chi – pătrat* a relevat existența unei asocieri semnificative statistic între expresia FoxP3 și prezența ulcerăției, $\chi^2=6.070$,

$p=0.048$, iar coeficienții Phi și V al lui Cramer (0.345) relevă că legătura dintre cele două variabile este una moderată ($p=0.048$). Astfel, tumorile cu FoxP3 frecvente prezintă semnificativ mai des ulcerație comparativ cu tumorile care au o valoare negativă sau rară a FoxP3.

În lotul de melanoame cutanate au predominat cazurile cu expresie crescută a CD4 (52.94%). 29.42% au avut densitate moderată a expresiei CD4 și doar 5.88% au prezentat expresie negativă a acestui parametru. În ceea ce privește distribuția cazurilor în funcție de expresia CD4 și indicele Breslow am observat faptul că, indiferent de indicele Breslow, 42% - 66% din cazuri au prezentat densitate crescută a expresiei CD4. Prin aplicarea *testului Chi-pătrat* nu s-a observat vreo asociere semnificativă statistic între expresia CD4 și indicele Breslow determinate la pacienții cu melanom cutanat. ($p=0.796$)

60.78% dintre pacienți au prezentat o densitate crescută a expresiei CD8, 35.29% au prezentat densitate moderată și doar 3.92% densitate scăzută. Nu au fost înregistrate cazuri cu CD8 negativ. Aplicarea *testului Kruskal-Wallis* nu a relevat diferențe semnificative statistic în ceea ce privește vârsta pacienților din grupurile cu densități scăzute, moderate sau crescute ale expresiei CD4. ($p=0.685$) În funcție de sexul pacientului, se observă o incidență mai mare a cazurilor cu densitate crescută a CD8 în rândul bărbaților (73%) decât în rândul femeilor (48%), femeile având un raport echilibrat al cazurilor cu densitate crescută și moderată comparativ cu bărbații. Diferențele nu sunt însă semnificative statistic ($p=0.0168$).

În ceea ce privește distribuția cazurilor în funcție de expresia CD8 și indicele Breslow se observă o incidență crescută a expresiei CD8 cu procente ce variază între 37.5% și 75% iar prin aplicarea *testului Chi-pătrat* nu s-a observat vreo asociere semnificativă statistic între acești parametri. ($p=0.604$) Nici între nivelul de invazie Clark și expresia CD8 nu s-a obținut o asociere semnificativă statistic ($p=0.310$). În lotul pacienților cu melanom cutanat se remarcă absența ulcerației la cazurile cu densitate scăzută a expresiei CD8, iar pentru cele cu densitate moderată sau crescută, incidența ulcerației este similară (la aproximativ un sfert din cazuri). Nu există dovezi semnificative statistic care să indice o asociere între densitatea expresiei CD8 și prezența ulcerației. ($p=0.697$)

În ceea ce privește indicele mitotic, se observă că pacienții cu densitate scăzută a expresiei CD8 au avut exclusiv indici mitotici de 0-5 mitoze/mm², iar în cazul celor cu densități moderate sau crescute, indicii mitotici de 6-10 mitoze/mm² și ≥ 11 mitoze/mm² au avut incidențe similare.

Nu există însă dovezi semnificative statistic care să indice o asociere între densitatea expresiei CD8 și indicele mitotic asociat tumorii. ($p=0.977$)

Deși tendința nu este una semnificativă statistic ($p=0.162$), se observă o creștere a incidenței regresiei tumorale odată cu creșterea densității expresiei CD8. Astfel, niciunul dintre cazurile cu densitate scăzută a expresiei CD8 nu a prezentat regresie tumorală. Au prezentat regresie tumorală 44.44% dintre cazurile cu densitate moderată a expresiei CD8 și 61.29% dintre cazurile cu densitate crescută a expresiei.

În lotul de melanoame cutanate, expresia CEACAM1 a fost pozitivă la 80.39% dintre pacienți. Dintre aceștia, 78% au prezentat expresie pozitivă la nivel citoplasmatic, 36% la nivel membranar și 33.33% au avut expresie CEACAM1 pozitivă atât citoplasmatic, cât și membranar. De asemenea, am remarcat faptul că marea majoritate a cazurilor ce au prezentat CEACAM1 membranar au asociat și CEACAM1 citoplasmatic (94.44%). Între cazurile cu CEACAM1 citoplasmatic, doar 43.58% au prezentat și CEACAM1 membranar. Se observă faptul că ulcerarea tumorală este prezentă exclusiv la pacienți care au prezentat CEACAM1 pozitiv, mai precis la 26.83% dintre aceștia. Ne putem gândi că pacienților cu ulcerare le este caracteristică o expresie CEACAM1 pozitivă dar asocierea dintre prezența ulcerării și expresia CEACAM1 nu este semnificativă statistic ($p=0.064$). Am mai remarcat faptul că incidența ulcerării crește în cazul pacienților cu expresia CEACAM1 citoplasmatic pozitivă (28.21%). Am obținut o asociere semnificativă statistic ($\chi^2 = 3.978$, $p=0.046$) între CEACAM1 citoplasmatic și ulcerare tumorală. Coeficienții Phi și V a lui Cramer (0.282) indică o legătură directă, dar slabă, între aceștia ($p=0.046$).

7. ANALIZA CORELAȚIILOR CLINICO-PATOLOGICE ÎN LOTUL CONTROL (NEVI) ȘI ANALIZA COMPARATIVĂ DINTRE CELE DOUĂ LOTURI STUDIATE – REZULTATE ȘI DISCUȚII

Lotul control studiat include 14 pacienți cu nevi, majoritatea fiind femei (78.57% dintre pacienți). Vârsta medie a pacienților analizați a fost de 36.14 ani (deviația standard 13.50; CI: [28.35; 43.94]), fără a înregistra diferențe majore între sexe. Vârsta medie a pacienților de sex feminin a fost de 34.73 ani și cea a bărbaților de 41.33 ani.

În lotul control expresia FoxP3 a prezentat în majoritatea cazurilor valori negative. Astfel, 71.4% dintre pacienți au înregistrat valori negative ale expresiei FoxP3 și 28.57% dintre pacienți au înregistrat valori rare. Spre deosebire de aceștia, pacienții cu melanoame cutanate au înregistrat expresie negativă a FoxP3 în 37.25% din cazuri, rare în 49.02% din cazuri și frecvente în 13.73% din cazuri. Cu toate acestea, aplicarea *testului Chi-pătrat* nu a indicat diferențe semnificative statistic între cele două loturi în ceea ce privește distribuția valorilor expresiei FoxP3. ($p=0.054$)

Pacienții din lotul control tind să aibă valori negative ale expresiei CD4, pe când pacienții din lotul de melanoame cutanate au preponderent densități crescute ale expresiei CD4. Astfel, mai mult de jumătate dintre pacienții din lotul control (57.1%) au prezentat valori negative ale expresiei CD4 iar restul au prezentat în mod egal fie densități scăzute, fie densități moderate (21.4% pentru fiecare), fără a se înregistra densități crescute ale acesteia. Comparativ cu aceștia, mai mult de jumătate dintre pacienții din lotul de melanoame cutanate au prezentat densitate crescută a expresiei CD4 (52.94%), 29.42% au prezentat densitate moderată (15), 11.76% densitate scăzută (6) și doar 5.88% au avut valori negative ale expresiei CD4 (3). Există o asociere semnificativă statistic între valoarea expresiei CD4 și lotul din care face parte pacientul ($\chi^2=25.461$, $p\leq 0.001$) iar coeficienții Phi și V al lui Cramer (0.626) relevă că legătura dintre cele două variabile este una puternică ($p\leq 0.001$).

Expresia CD8 a fost negativă la aproximativ două treimi din pacienții din lotul control (64.29%) și nu s-au întâlnit densități crescute ale acesteia. În lotul de melanoame cutanate expresia CD8 nu a înregistrat valori negative dar a avut densitatea crescută în 60.78% dintre cazuri, densitate moderată pentru 35.29% și densitate scăzută pentru doar 3.92% dintre pacienți. Am obținut o asociere semnificativă statistic între expresia CD8 și lotul din care face parte pacientul ($\chi^2=43.867$, $p\leq 0.001$) iar coeficienții Phi și V al lui Cramer (0.822) relevă că legătura dintre cele două variabile

este una foarte puternică ($p \leq 0.001$). Putem afirma că pacienții din lotul control tind să aibă valori negative ale expresiei CD8, pe când pacienții din lotul de melanoame cutanate au preponderent densități crescute ale expresiei CD8.

Toți pacienții din lotul de nevi au prezentat o valoare negativă a expresiei CD3 iar pacienții din lotul de melanoamelor cutanate au avut frecvent densități moderate sau crescute ale CD3 (35.29% respectiv 41.18%). Am obținut o asociere semnificativă statistic între valoarea expresiei CD3 și lotul din care face parte pacientul ($\chi^2=27.231$, $p \leq 0.001$) iar coeficienții Phi și V al lui Cramer (0.937) au relevat o legătură foarte puternică între cele două variabile.

Expresia CD20 a înregistrat valori negative la toți pacienții din lotul de nevi și predominant pozitive în cazul melanoamelor. *Testul Chi-pătrat* a relevat o asociere semnificativă statistic între valoarea expresiei CD20 și lotul din care face parte pacientul ($\chi^2=17.029$, $p=0.001$) iar coeficienții Phi și V al lui Cramer (0.729) au arătat că legătura dintre cele două variabile este una puternică ($p=0.001$).

Pacienții din lotul de nevi tind să aibă valori negative (64.29%) sau cel mult expresii scăzute (35.71%) ale expresiei CD11c, pe când pacienții din lotul de melanoame cutanate prezintă mai frecvent expresie crescută sau moderată ale acesteia. Asocierea dintre expresia CD11c și lotul din care face parte pacientul a fost semnificativă statistic ($\chi^2=11.005$, $p=0.004$) iar coeficienții Phi și V al lui Cramer (0.596) au evidențiat o legătură puternică între cele două variabile.

În lotul control doar 21.43% dintre cazuri au prezentat o expresie CEACAM1 pozitivă, aceasta fiind exprimată exclusiv la nivel citoplasmatic. În lotul de melanoame însă, CEACAM1 a fost exprimată în proporție de 80.39%, predominant la nivel citoplasmatic (95.12%). Spre deosebire de lotul de nevi, în lotul de melanoame cutanate a fost întâlnită și expresia CEACAM1 la nivel membranar, acestea reprezentând 43.9% dintre cazurile cu o valoare pozitivă a expresiei CEACAM1. *Testul Chi-pătrat* a relevat o asociere semnificativă statistic între expresia CEACAM1 și lotul din care face parte pacientul ($\chi^2=17.463$, $p \leq 0.001$) iar coeficienții Phi și V al lui Cramer (0.518) au indicat o legătură puternică între cele două variabile. Aceste test ne indică faptul că pacienții din lotul de melanoame au mult mai frecvent asociată o valoare pozitivă a expresiei CEACAM1, spre deosebire de pacienții cu nevi, care în cele mai multe cazuri prezintă valori negative ale expresiei CEACAM1. Pacienții din lotul de melanoame au asociat mai frecvent o valoare pozitivă a expresiei CEACAM1 citoplasmatic, spre deosebire de pacienții din lotul control, care, în cele mai multe cazuri prezintă valori negative ale expresiei CEACAM1. Această asociere

a fost semnificativă statistic ($\chi^2=15.517$, $p\leq 0.001$) iar coeficienții Phi și V al lui Cramer (0.492) au relevat o legătură moderat - puternică între cele două variabile. În ceea ce privește expresia CEACAM1 la nivel membranar a reieșit faptul că pacienții din lotul de melanoame au mai frecvent asociată o valoare pozitivă a acestei expresii în comparație cu pacienții cu nevi, care prezintă exclusiv valori negative. Există o asociere semnificativă statistic între expresia CEACAM1 membranar și lotul din care face parte pacientul ($\chi^2=7.012$, $p=0.008$) iar coeficienții Phi și V al lui Cramer (0.331) au relevat o legătură moderată între cele două variabile ($p = 0.008$).

8. CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

CONCLUZII

- ✓ Am obținut o corelație semnificativă statistic între indicele Clark și vârsta pacienților, astfel, creșterea nivelului de invazie se produce odată cu creșterea vârstei pacienților. Nivelul Clark crescut se corelează și cu prezența ulcerăției, aceasta fiind mai frecventă în cazul tumorilor cu nivel de invazie IV sau V. ($p=0.002$) Vârsta înaintată și ulcerăția sunt cunoscuți ca fiind factori de prognostic slab pentru pacienții pentru melanom. Multe studii au indicat o corelație inversă între profunzimea invaziei tumorale și supraviețuirea pacientului iar corelația nivelului Clark cu acești parametri concordă cu datele din literatură.
- ✓ Am remarcat o asociere puternică semnificativă statistic între indicele Breslow și nivelul de invazie Clark. Astfel, un indice Breslow mai mic este asociat cu un nivel mai scăzut al indicelui Clark, iar un indice Breslow crescut este asociat cu un nivel mai ridicat al indicelui Clark. Indicele Breslow crescut se corelează puternic și cu prezența ulcerăției ($p<0.001$). Datele din literatură ne indică faptul că prezența și rolul prognostic al ulcerăției sunt influențate de grosimea tumorii și că incidența acesteia crește cu creșterea indicelui Breslow. [219]
- ✓ Există o asociere între indicele mitotic și vârsta pacienților cu melanom, în sensul că pacienții care au un indice mitotic mai mare de 5 tind să aibă o vârstă mult mai înaintată comparativ cu cei care prezintă un indice mitotic ≤ 5 . ($p=0.021$) Indicele mitotic s-a asociat și cu nivelul de invazie Clark. Toate melanoamele cu indice mitotic peste 5 mitoze/mm² au asociat un indice Clark de IV sau V, pe când în cazul tumorilor cu indice mitotic de 0-5 mitoze/mm² au predominat indici Clark între I și III. ($p=0.011$). Într-un studiu retrospectiv recent, cercetătorii au dezvăluit că rata mitotică este cel mai puternic predictor al supraviețuirii după biopsia pozitivă a ganglionilor limfatici sentinelă [185]. Un alt studiu amplu a concluzionat că rata mitotică este un predictor independent pentru supraviețuire [222].

STUDIUL REGRESIEI TUMORALE

- ✓ Rolul prognostic al regresiei histologice în melanomul cutanat primar este controversat. În mod tradițional, regresia histologică a fost considerată un factor de prognostic negativ deoarece se consideră că afectează evaluarea corectă a grosimii Breslow [20], [178]–[180] Alți autori

consideră că regresia tumorală are un rol pozitiv prin faptul că sistemul imun al pacientului este intact și capabil să genereze un răspuns imun [18], [19], [181] și să scadă riscul de dezvoltare a metastazelor. [182]

- ✓ Am obținut diferențe semnificative statistic între vârsta pacienților cu regresie tumorală și vârsta pacienților fără regresie tumorală. Pacienții care prezintă regresie tumorală tind să aibă o vârstă mai înaintată comparativ cu cei care nu prezintă regresie tumorală.
- ✓ Prezența regresiei tumorale s-a asociat și cu prezența ulcerăției; am obținut astfel o frecvență de apariție mai mare a ulcerăției la melanoamele cu regresie tumorală, comparativ cu cele fără regresie tumorală. ($p=0.02$)
- ✓ O asociere semnificativă statistic am obținut și între regresia tumorală și indicele mitotic ($p=0.015$). Se poate spune că, în cazul lotului de melanoame studiat regresia tumorală tinde să fie specifică tuturor tumorilor care au asociat un indice mitotic peste 5 mitoze/mm².
- ✓ În lotul de melanoame studiat s-a înregistrat o creștere a incidenței cazurilor cu regresie tumorală odată cu creșterea grosimii tumorale Breslow și o frecvență mai ridicată în cazul tumorilor cu indice Clark IV-V. Pentru acești parametri nu au fost obținute însă asocieri semnificative statistic. ($p=0.157$)
- ✓ Am remarcat tendința ca melanoamele cu regresie să aibă asociate densități crescute ale CD4, pe când cele fără regresie sunt mai des asociate cu densități moderate ale expresiei CD4. ($p=0.018$)
- ✓ Deși tendința nu este una semnificativă statistic ($p=0.162$), se observă o creștere a incidenței regresiei tumorale odată cu creșterea densității expresiei CD8. Astfel, niciunul dintre cazurile cu densitate scăzută a expresiei CD8 nu a prezentat regresie tumorală.
- ✓ Am observat că incidența regresiei tumorale este mai ridicată în cazurile în care expresia CD20 este negativă sau are densitate scăzută. Odată cu creșterea densității expresiei CD20, regresia tumorală nu mai apare. Cu toate acestea, o asociere între regresia tumorală și expresia CD20 nu este semnificativă statistic ($p=0.561$)
- ✓ Am remarcat faptul că incidența regresiei tumorale crește odată cu creșterea expresiei CD11c, fără a se evidenția însă o asociere semnificativă statistic între cei doi parametri. ($p=0.334$) Regresia tumorală a fost absentă la cazurile ce au prezentat CD11c negativ.
- ✓ Se constată o creștere a incidenței regresiei tumorale în cazul pacienților care au prezentat CEACAM1 pozitiv în comparație cu cei care au avut expresie negativă. Astfel, deși nu marchează o diferență semnificativă ($p=0.360$), regresia tumorală este întâlnită la mai mult de jumătate din

cazurile cu CEACAM1 pozitiv (56.1%), pe când, la pacienții cu CEACAM1 negativ, aceasta este întâlnită mai puțin frecvent (40%). Incidența regresiei tumorale se menține ridicată și în rândul pacienților cu expresie pozitivă a CEACAM1 citoplasmatic, cel mai ridicat nivel fiind înregistrat la pacienții cu CEACAM1 citoplasmatic moderat pozitiv (70%) fără a marca însă o asociere între cazurile de regresie tumorală și intensitatea expresiei CEACAM1 citoplasmatic ($p=0.637$). În cazul pacienților cu CEACAM1 membranar se remarcă o prezență crescută a regresiei tumorale, nu am obținut însă corelații între intensitatea expresiei CEACAM1 membranar și prezența regresiei tumorale ($p=0.325$).

STUDIUL INFILTRATULUI INFLAMATOR

- ✓ În cadrul lotului studiat nu s-au evidențiat asocieri semnificative statistic între intensitatea infiltratului inflamator și vârsta, sexul, regresia tumorală sau indicii Clark și Breslow.
- ✓ Nu s-au observat asocieri semnificative statistic între vârsta sau sexul pacienților și prezența infiltratului inflamator și respectiv prezența infiltratului inflamator intratumoral și indicii Breslow.
- ✓ Fără a exista o diferență semnificativă statistic, o incidență mai mare a infiltratului inflamator intratumoral a fost întâlnită la cei cu indice Clark I-III (54.11%), față de cei cu indice Clark IV-V (45.83%).
- ✓ Regresia tumorală a fost întâlnită mai frecvent la pacienții cu infiltrat inflamator intratumoral comparativ cu cei la care nu a fost prezent infiltrat inflamator intratumoral, fără a se obține o asociere semnificativă statistic între cei doi parametri. ($p=0.394$)
- ✓ Atât în cazul tumorilor cu indice Clark I-III, cât și la cele cu nivel IV-V, a fost întâlnit infiltratul inflamator peritumoral într-o proporție de 81.48%.
- ✓ În ceea ce privește expresia CD1a se remarcă o creștere a densității acesteia odată cu creșterea incidenței indicelui Clark IV-V. Această asociere este semnificativă statistic iar legătura dintre cele două variabile este puternică. ($p=0.031$) Expresia CD1a se corelează și cu prezența ulcerăției. Astfel, tumorile cu CD1a frecvente prezintă semnificativ mai des ulcerăție comparativ cu tumorile care au o altă expresie a CD1a (negativ, rare). ($p=0.039$) Mai multe studii au arătat că infiltrarea celulelor tumorale cu celulele dendritice CD-1a+ la nivel tumoral și peritumoral se corelează cu grosimea tumorală scăzută și cu prezența fazei de creștere radiale a tumorii. [289],

[290] Un alt studiu a observat însă o creștere semnificativă a CD-CD1a+ la nivelul melanoamelor primare cutanate comparativ cu tegumentul normal și nevii melanocitari.

- ✓ Tumorile cu FoxP3 frecvente prezintă semnificativ mai des ulcerație comparativ cu tumorile care au o valoare negativă sau rară a FoxP3. ($p=0.048$) FoxP3 reflectă totalitatea celulelor T la nivel epitelial și astfel este considerat în cele mai multe cazuri un factor de prognostic nefavorabil.
- ✓ Am remarcat faptul că pacienții cu densitate scăzută a expresiei CD3 tind să prezinte mai frecvent ulcerație comparativ cu pacienții care au alte valori ale expresiei CD3. ($p=0.014$)

ANALIZA EXPRESIEI CEACAM1

- ✓ Am mai remarcat faptul că incidența ulcerației crește în cazul pacienților cu expresia CEACAM1 citoplasmatic pozitivă (28.21%). Am obținut o asociere semnificativă statistic între cei doi parametri ($p=0.046$).
- ✓ În cazul melanoamelor cu CEACAM1 pozitiv la nivel citoplasmatic a predominat expresia scăzută a CD20 (66.67%) iar pentru CEACAM1 membranar cea negativă (62.5%). Aceste diferențe au fost semnificative statistic iar legătura dintre cele două variabile este una puternică ($p=0.04$).

ANALIZA IMUNOHISTOCIMICĂ COMPARATIVĂ ÎNTRE CELE DOUĂ LOTURI STUDIAȚE

- ✓ Pacienții din lotul control tind să aibă valori negative ale expresiei CD4, pe când pacienții din lotul de melanoame cutanate au preponderent densități crescute ale expresiei CD4. Asocierea dintre valoarea expresiei CD4 și lotul din care face parte pacientul este semnificativă statistic ($p \leq 0.001$) iar legătura dintre cele două variabile este una puternică. Există puține date în literatura de specialitate despre rolul prognostic al limfocitelor CD4+ în melanom. Un studiu realizat pe melanomul metastatic a identificat o corelație semnificativă a infiltrării crescute cu TILs CD4+ și creșterea supraviețuirii generale. [303] Alte studii nu au putut identifica însă o legătură între prezența acestor celule în infiltratul inflamator tumoral și prognosticul pacienților cu melanom. [304] La fel ca în cazul limfocitelor T CD8+, limfocitele T helper CD4+ dețin o varietate de funcții și fenotipuri [305], lucru care face dificilă interpretarea rolului lor prognostic în cancer.

- ✓ Pacienții din lotul control tind să aibă valori negative ale expresiei CD8, pe când pacienții din lotul de melanoame cutanate au preponderent densități crescute ale expresiei CD8. ($p \leq 0.001$) Un studiu recent de tip cohortă efectuat pe melanoame cutanate primare a observat o asociere între cantitatea crescută a limfocitelor T CD8+ la nivel tumoral și creșterea supraviețuirii. Astfel, supraviețuirea la 5 ani a pacienților a fost de 78 % pentru cazurile de melanoame cu infiltrat tumoral limfocitar CD8+ crescut, 44 % pentru infiltrat moderat și 25 % pentru infiltrat scăzut. [293], [309] Un alt studiu extins publicat în 2011 nu a identificat însă o corelație semnificativă între TILs CD8+ și supraviețuirea pacienților. [310] Aceste studii sugerează complexitatea demonstrării rolului prognostic al limfocitelor T citotoxice.
- ✓ Toți pacienții din lotul de nevi au prezentat o valoare negativă a expresiei CD3 iar pacienții din lotul de melanoamelor cutanate au avut frecvent densități moderate sau crescute ale CD3. ($p \leq 0.001$)
- ✓ Expresia CD20 a înregistrat valori negative la toți pacienții din lotul de nevi și predominant pozitive în cazul melanoamelor. *Testul Chi-pătrat* a relevat o asociere semnificativă statistic între valoarea expresiei CD20 și lotul din care face parte pacientul ($p = 0.001$) iar legătura dintre cele două variabile este una puternică ($p = 0.001$). În cazul melanomului cutanat primar, majoritatea studiilor au relevat o asociere pozitivă cu supraviețuirea. [316], [317]
- ✓ Pacienții din lotul de nevi tind să aibă valori negative sau cel mult expresii scăzute ale expresiei CD11c, pe când pacienții din lotul de melanoame cutanate prezintă mai frecvent expresie crescută sau moderată ale acesteia. Asocierea dintre expresia CD11c și lotul din care face parte pacientul a fost semnificativă statistic iar legătura dintre cele două variabile este puternică. ($p = 0.004$)
- ✓ Pacienții din lotul de melanoame au prezentat mai frecvent o valoare pozitivă a expresiei CEACAM1, spre deosebire de pacienții cu nevi, care în cele mai multe cazuri prezintă valori negative ale expresiei CEACAM1. ($p \leq 0.001$)
- ✓ Pacienții din lotul de melanoame au asociat mai frecvent o valoare pozitivă a expresiei CEACAM1 citoplasmatic, spre deosebire de pacienții din lotul control, care, în cele mai multe cazuri prezintă valori negative ale expresiei CEACAM1. Această asociere a fost semnificativă statistic iar legătura dintre cele două variabile a fost moderat-puternică ($p \leq 0.001$). În ceea ce privește expresia CEACAM1 la nivel membranal a reieșit faptul că pacienții din lotul de melanoame au mai frecvent asociată o valoare pozitivă a acestei expresii în comparație cu pacienții cu nevi, care prezintă exclusiv valori negative. Există o asociere semnificativă statistic

între expresia CEACAM1 membranar și lotul din care face parte pacientul ($p=0.008$). Într-un studiu publicat de Thies *et al.* în 2002 [242], [254] s-a identificat prin analiza Kaplan-Meier o corelație înalt semnificativă statistic între expresia CEACAM1 și apariția metastazelor ($p < 0.0001$). Pe lângă aceasta, analiza regresivă multivariată Cox a confirmat faptul că CEACAM1 este un factor independent pentru riscul de metastazare, având cu o valoare predictivă superioară grosimii tumorale.[242] Rezultatele unui alt studiu publicat în 2009 de către Gamblicher *et al.* a susținut studiile anterioare prin faptul că CEACAM1 poate avea un rol important în progresia tumorală în melanoamele cutanate. [242], [262] Sunt însă puține studii care să analizeze în mod sistematic expresia CEACAM1 în melanom.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

În prezentul studiu am realizat o analiză amănunțită a literaturii de specialitate în ceea ce privește actualele ghiduri și clasificări în melanom și am subliniat lipsa unor criterii ferme de stratificare a riscului pacienților cu această patologie. Având ca punct de pornire necesitatea identificării de noi factori prognostici și noi opțiuni terapeutice posibile, am realizat corelații clinico-patologice în melanomul cu și fără regresie și nevi comuni. Am folosit colorații histopatologice clasice dar și tehnici moderne de imunohistochimie, acestea din urmă constituind baza a numeroase cercetări actuale cu privire la înțelegerea mecanismelor complexe ale carcinogenezei.

Rezultatele obținute în urma acestui studiu s-au bazat pe extinderea cunoștințelor privind aspectele histopatologice și imunohistochimice ce caracterizează melanomul și identificarea markerilor specifici de evoluție și prognostic pentru acesta. Totodată, am descris și analizat principalele mecanisme ce stau la baza imunogenicității în melanom și anume fenomenul de regresie tumorală și prezența și componența infiltratului limfocitar tumoral. Sunt necesare studii suplimentare care să analizeze exhaustiv mecanismele descrise.

Această analiză complexă a melanomului cutanat evidențiază necesitatea unor cercetări ulterioare care să coreleze profilul imunologic al leziunilor obținut cu date despre evoluție, răspuns la tratament și ratele de recurență locală sau la distanță ale tumorilor. Acestea ar duce la un management optimizat în melanomul cutanat. Consider, astfel, că acest studiu reprezintă o contribuție importantă în domeniu și furnizează noi perspective de cercetare cu privire la progresia în melanom.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ (DIN TOTAL DE 327 REFERINȚE)

- [1] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2019," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 69, no. 1, pp. 7–34, Jan. 2019.
- [2] A. C. Society, "American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2020," *American Cancer Society*. pp. 1–52, 2020.
- [3] H. Tsao and K. Niendorf, "Genetic testing in hereditary melanoma," *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 51, no. 5, pp. 803–808, 2004.
- [4] S. Gandini *et al.*, "Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure," *Eur. J. Cancer*, vol. 41, no. 1, pp. 45–60, Jan. 2005.
- [5] T. J. Hieken, T. E. Grotz, N. I. Comfere, J. W. Inselman, and E. B. Habermann, "The effect of the AJCC 7th edition change in T1 melanoma substaging on national utilization and outcomes of sentinel lymph node biopsy for thin melanoma," *Melanoma Res.*, vol. 25, no. 2, pp. 157–163, 2015.
- [6] D. E. Dye, S. Medic, M. Ziman, and D. R. Coombe, "Melanoma biomolecules: Independently identified but functionally intertwined," *Front. Oncol.*, vol. 3 SEP, no. September, pp. 1–17, 2013.
- [7] G. Karakousis *et al.*, "Thin Melanoma with Nodal Involvement: Analysis of Demographic, Pathologic, and Treatment Factors with Regard to Prognosis," *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 24, no. 4, pp. 952–959, 2017.
- [8] C. Prieto-Granada, N. Howe, and T. McCardle, "Melanoma Pathology," *Melanoma*, vol. 1012, pp. 10–30, 2016.
- [9] S. N. Markovic *et al.*, "Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis," *Mayo Clin. Proc.*, vol. 82, no. 3, pp. 364–380, 2007.
- [10] J. E. Gershenwald *et al.*, "Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 67, no. 6, pp. 472–492, Nov. 2017.
- [11] D. G. Coit *et al.*, "Melanoma, Version 2.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology.," *J. Natl. Compr. Canc. Netw.*, vol. 14, no. 4, pp. 450–73, Apr. 2016.
- [12] V. Shankaran *et al.*, "IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity," *Nature*, vol. 410, no. 6832, pp. 1107–1111, Apr. 2001.
- [13] A. Passarelli, F. Mannavola, L. S. Stucci, M. Tucci, and F. Silvestris, "Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape," *Oncotarget*, vol. 8, no. 62, pp. 106132–106142, 2017.
- [14] R. E. Langman and M. Cohn, "Self-nonsel self discrimination revisited. Introduction," *Semin. Immunol.*, vol. 12, no. 3, pp. 159–162, 2000.
- [15] A. Mantovani, P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill, "Cancer-related inflammation," *Nature*, vol. 454, no. 7203, pp. 436–444, 2008.
- [16] O.-A. S *et al.*, "Phenotypic characterisation of immune cells associated with histological regression in cutaneous melanoma," *Pathology*, vol. 51, no. 5, pp. 487–493, Aug. 2019.
- [17] T. A *et al.*, "Clinical considerations on sentinel node biopsy in melanoma from an Italian multicentric study on 1,313 patients (SOLISM-IMI)," *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 16, no. 7, pp. 2018–2027, Jul. 2009.
- [18] R. S *et al.*, "Favourable prognostic role of regression of primary melanoma in AJCC stage I-II patients," *Br. J. Dermatol.*, vol. 169, no. 6, pp. 1240–1245, 2013.
- [19] C. AM, A. PC, and K. A, "Reporting regression in primary cutaneous melanoma. Part 2: prognosis, evaluation and management," *Clin. Exp. Dermatol.*, vol. 45, no. 7, pp. 818–823, Oct. 2020.
- [20] R. S, "Histological regression in primary melanoma and drug-related immune reaction towards metastatic melanoma: Are they associated?," *Med. Hypotheses*, vol. 143, Oct. 2020.
- [21] R. S *et al.*, "Unknown Primary Melanoma: Worldwide Survey on Clinical Management," *Dermatology*, vol. 232, no. 6, pp. 704–707, Apr. 2016.
- [22] N. L *et al.*, "Comparative analysis of CEACAM1 expression in thin melanomas with and without

- regression,” *Oncol. Lett.*, vol. 17, no. 5, pp. 4149–4154, May 2019.
- [23] H. I and S. BB, “Size Matters: The Functional Role of the CEACAM1 Isoform Signature and Its Impact for NK Cell-Mediated Killing in Melanoma,” *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 3, Mar. 2019.
- [24] T. G *et al.*, “CEACAM1: Expression and Role in Melanocyte Transformation,” *Dis. Markers*, vol. 2016, 2016.
- [25] E. A *et al.*, “CEACAM1 enhances invasion and migration of melanocytic and melanoma cells,” *Am. J. Pathol.*, vol. 165, no. 5, pp. 1781–1787, 2004.
- [26] N. M, “The immune system--a hidden treasure for biomarker discovery in cutaneous melanoma,” *Adv. Clin. Chem.*, vol. 58, pp. 89–140, 2012.
- [27] S. S *et al.*, “Serum CEACAM1 Correlates with Disease Progression and Survival in Malignant Melanoma Patients,” *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2012, 2012.
- [28] K. N *et al.*, “Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule-1 (CEACAM1) in posterior uveal melanoma: correlation with clinical and histological survival markers,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 52, no. 13, pp. 9368–9372, Dec. 2011.
- [29] G. PA and G. D, “Prognostication in thin cutaneous melanomas,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 134, no. 12, pp. 1758–1763, Dec. 2010.
- [30] K. G. Paulson *et al.*, “Age-Specific Incidence of Melanoma in the United States,” *JAMA dermatology*, vol. 156, no. 1, pp. 57–64, Jan. 2020.
- [31] “<https://ecis.jrc.ec.europa.eu/> Accesat 09.12.2021.” .
- [32] B. Mukherji, “Immunology of melanoma,” *Clin. Dermatol.*, vol. 31, no. 2, pp. 156–165, 2013.
- [33] R. I. Nedelcu *et al.*, “Morphological features of melanocytic tumors with depigmented halo: review of the literature and personal results.,” *Rom. J. Morphol. Embryol.*, vol. 56, no. 2 Suppl, pp. 659–63, 2015.
- [34] F. Azimi *et al.*, “Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma.,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 21, pp. 2678–83, 2012.
- [35] C. G. Clemente, M. C. Mihm Jr., R. Bufalino, S. Zurrida, P. Collini, and N. Cascinelli, “Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma,” *Cancer*, vol. 77, no. 7, pp. 1303–1310, 1996.
- [36] W. H. Clark *et al.*, “Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression.,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 81, no. 24, pp. 1893–1904, 1989.
- [37] M. Tucci *et al.*, “Immune System Evasion as Hallmark of Melanoma Progression: The Role of Dendritic Cells,” *Front. Oncol.*, vol. 9, Nov. 2019.
- [38] D. Han *et al.*, “Clinicopathologic predictors of sentinel lymph node metastasis in thin melanoma,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 35, pp. 4387–4393, Dec. 2013.
- [39] W. H. Fridman, F. Pagès, C. Sauts-Fridman, and J. Galon, “The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 12, no. 4, pp. 298–306, Apr. 2012.
- [40] D. Mittal, M. M. Gubin, R. D. Schreiber, and M. J. Smyth, “New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 27, no. 1, pp. 16–25, Apr. 2014.
- [41] T. L. Whiteside, “The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth,” *Oncogene*, vol. 27, no. 45, pp. 5904–5912, Oct. 2008.
- [42] A. Bhatia and Y. Kumar, “Cancer-immune equilibrium: questions unanswered,” *Cancer Microenviron.*, vol. 4, no. 2, pp. 209–217, Aug. 2011.
- [43] J. A. Curtin *et al.*, “Distinct sets of genetic alterations in melanoma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 353, no. 20, pp. 2135–2147, Nov. 2005.
- [44] G. P. Dunn, L. J. Old, and R. D. Schreiber, “The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting,” *Immunity*, vol. 21, no. 2, pp. 137–148, Aug. 2004.
- [45] D. Daley *et al.*, “ $\gamma\delta$ T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining $\alpha\beta$ T Cell Activation,” *Cell*, vol. 166, no. 6, pp. 1485–1499.e15, Sep. 2016.

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE PUBLICATE PE PARCURSUL STUDIILOR DOCTORALE

ARTICOLE ISI CU FACTOR DE IMPACT PUBLICATE ÎN CALITATE DE AUTOR PRINCIPAL

1. **Antohe M**, RI Nedelcu, L Nichita, C Popp, M Cioplea, A Branzea, A Hodorogea, A Calinescu, DA Ion, C Diaconu, C Bleotu, ND Pirici, SA Zurac, G Turcu. Tumor infiltrating lymphocytes - the regulator of melanoma evolution. *Oncology Letters*, Volume 17, 2019, 4155:4161; **IF 1.871**
<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2019.9940>

ARTICOLE BDI PUBLICATE ÎN CALITATE DE AUTOR PRINCIPAL

1. **Antohe, M.**, Hulea, I., Coman, A., Brinzea, A., Nedelcu, R., Turcu, G., Moroianu, A., Balaban, M., Manea, L., David Niculescu, M., Balasescu, E., Zurac, S., Cioplea, M., Popp, C., Nichita, L., & Ion, D. (2021). TUMOR-INFILTRATING CD1A+ LANGERHANS CELLS IN PRIMARY CUTANEOUS MELANOMA – AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY. *Romanian Journal of Clinical Research*, 4(1).
<https://rjronline.com/index.php/rjcr/article/view/69>
2. **Antohe M**, Coman A, Turcu G, Nedelcu RI, Brinzea A, Balaban M, Moroianu A, Manea L, Hulea I, Balasescu E, Zurac SA, Cioplea M, Popp C, Nichita L, Ion DA. The prognostic significance of the clinical and histological parameters in primary cutaneous melanoma patients. *Med Pharm Rep.* 2022 Jul;95(3):229-235. doi: 10.15386/mpr-2142. Epub 2022 Jul 26. PMID: 36060503; PMCID: PMC9387583.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36060503/>

ARTICOLE ISI CU FACTOR DE IMPACT PUBLICATE ÎN CALITATE DE CO-AUTOR

1. Nedelcu R, Dobre A, Brinzea A, Hulea I, Andrei R, Zurac S, Balaban M, **Antohe M**, Manea L, Calinescu A, Coman A, Pantelimon F, Dobritoiu A, Popescu C, Popescu R, Balasescu

- E, Ion D, Turcu G. Current Challenges in Deciphering Sutton Nevi—Literature Review and Personal Experience. *Journal of Personalized Medicine*. 2021; 11(9):904.
<https://doi.org/10.3390/jpm11090904>
2. Anastasia Hodorozea, Andreea Călinescu, **Mihaela Antohe**, Mihaela Balaban, Roxana Ioana Nedelcu, Gabriela Turcu, Daniela Adriana Ion, Ioana Anca Badarau, Catalin Mihai Popescu, Raluca Popescu, Cristiana Popp, Mirela Cioplea, Luciana Nichita, Ionela Hulea and Alice Brinzea. Epithelial-Mesenchymal Transition in Skin Cancers: A Review. *Analytical Cellular Pathology* Volume 2019, Article ID 3851576, 11 pages, **IF 1.788**
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31934531/>
 3. A Brinzea, RI Nedelcu, G Turcu, **M Antohe**, A Hodorozea, A Calinescu, DA Ion, D Pirici, R Popescu, CM Popescu, C Popp, M Cioplea, SA Zurac. Matrixmetalloproteinases expression in lentigo maligna/lentigo maligna melanoma - a review of the literature and personal experience. *Rom J Morphol Embryol*. 2019;60(4):1091-1095.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32239083/>
 4. Andreea Călinescu, Gabriela Turcu, Roxana I. Nedelcu, Alice Brînzea, Anastasia Hodorozea, **Mihaela Antohe**, Carmen Diaconu, Coralia Bleotu, Nicolae D. Pirici, Lucia B. Jilăveanu, Daniela A. Ion, Ioana A. Badărău. On the dual role of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule1 (CEACAM1) in human malignancies. *Journal of Immunology Research*, Volume 2018, Article ID 7169081, 8 pages. **IF 3.404**
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6204181/>