

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



**Studiul histopatologic și imunohistochimic în
melanomul malign cu regresie tumorală**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF.UNIV.DR. STĂNICEANU FLORICA**

**Student-doctorand:
CIOPLEA MIRELA DANIELA**

2024

Cuprins

Introducere	10
I. PARTEA GENERALĂ - CONSIDERAȚII TEORETICE	
CAPITOLUL 1: Anatomia și histologia pielii	
1.1 Embriologie.....	11
1.1.1. Epiderm.....	11
1.1.2 Derm.....	12
1.1.3. Anexe.....	13
1.2. Histologia	13
1.2.1. Epiderm.....	14
1.2.2. Derm.....	18
1.2.3. Hipoderm.....	19
1.3. Vascularizația și inervația pielii.....	19
1.3.1. Vasele sanguine ale tegumentului.....	19
1.3.2. Vasele limfatice ale tegumentului.....	20
1.3.3 Sistemul nervos al pieii.....	20
CAPITOLUL 2: Etiopatogenia melanomului malign	22
2.1. Epidemiologie.....	22
2.1.1 Incidență.....	22
2.1.2 Mortalitatea.....	23
2.1.3 Suparviețuirea.....	24
2.2. Factori de risc.....	25
2.2.1. Expunerea la soare.....	25
2.2.2. Aparatele de bronzat.....	25
2.2.3. Imunosupresia.....	26
2.2.5. Istoric familial.....	26
2.2.6. Obezitatea.....	26
2.3. Leziuni precursoare ale melanomului malign:	26
Capitolul 3: Criterii de diagnostic clinic, clasificare, histopatologia și imunohistochimia melanomului malign	28
3.1. Criterii clinice de diagnostic ale melanomului malign.....	28
3.1.1. Asimetria.....	29
3.1.2. Marginile tumorii:.....	29

3.1.3. Culoarea.....	29
3.1.4. Diametrul.....	30
3.1.5. Evoluție.....	30
3.2. Clasificare, tipuri, diagnosticul histopatologic și imunohistochimia melanomului malign.....	30
3.2.1. Melanoame asociate cu expunerea la soare.....	31
3.2.2. Melanoame independente de expunerea la soare.....	36
CAPITOLUL 4: Factorii de pronostic în melanomul malign.....	46
4.1. Factorii de pronostic clinici.....	56
4.1.1. Vârsta pacientului.....	46
4.1.2. Sexul pacientului	46
4.1.3. Culoarea tegumentului (tipul de piele)	47
4.1.4. Localizarea anatomică a tumorii primare.....	47
4.2. Factori de pronostic histopatologici.....	47
4.2.1. Grosimea tumorală (indicele Breslow)	47
4.2.2. Ulcerația.....	48
4.2.3. Indexul mitotic.....	48
4.2.4 Nivelul de invazie al MM (nivelul Clark)	48
4.2.5 Noduli microsatelitari.....	49
4.2. 6 Limfocitele infiltrative tumorale (TILs)	49
4.2.7. Invazia limfo-vasculară și peri/intraneurală.....	49
4.2.8. Metastazele în ganglionii santinelă (ganglioni regionali)	49
CAPITOLUL 5: Regresia tumorală în melanomul malign.....	51
5.1. Patogeneza regresiei tumorale în melanomul malign.....	51
5.2. Clasificarea regresiei tumorale în melanomul malign.....	52
5.3. Prognosticul regresiei tumorale spontane în MM.....	53
II. PARTEA SPECIALĂ - Contribuții personale	
CAPITOLUL 6: Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	54
CAPITOLUL 7: Metodologia generală a cercetării.....	56
7.1. Materialul studiat.....	56
7.1.1 Caracteristicile loturilor studiate.....	56
7.1.2. Criterii de includere/excludere a cazurilor în studiu.....	56.
7.2. Metode de investigare	57
7.2.1. Colorația uzuală hematoxilină eozină.....	58

7.2.2. Tehnici și colorații imunohistochimice utilizate.....	58
7.2.3. Evaluarea parametrilor studiați.....	61
7.3. Colectarea și analiza statistică a datelor.....	61.
CAPITOLUL 8:Rezultate	62
8.1 Date demografice despre lotul studiat.....	62
8.1.1. Sexul și vârsta pacienților.....	62
8.2. Date morfologice și clinice:.....	65
8.2.1. Localizare.....	65
8.2.2 Ulcerația	67
8.2.3 Grosimea tumorală (indice Breslow).....	68
8.2.4. Rata mitotică.....	69
8.2.5 Nivelul de invazie Clark.....	71
8.2.6. Regresia tumorală	71
8.3 Markerii imunohistochimice în ariile de regresie tumorală corelații cu ariile nonregresate.....	73
8.3.1 Studiul imunohistochimic al celulelor dendritice în lotul studiat.....	73
8.3.2. Studiul imunohistochimic al celulelor CD4, CD8 pozitive în lotul studiat...	79
8.3.3 Prezența celulelor FOXP3 pozitive și corelația lor cu celulele dendritice si limfocitele CD4+, CD8+.....	82
8.3.4 Prezența celulelor CEACAM1, MMPși TIMP pozitive	86
CAPITOLUL 9:DISCUȚII.....	103
9.1. Distribuția pacienților în funcție de vârstă, sex și localizare.....	103
9. 1.1. Vârsta:.....	103
9.1.2. Distribuția pacienților în funcție de sex:.....	104
9.1.3. Distribuția în funcție de localizarea tumorii în lotul studiat.....	105
9.2. Datele morfologice	105.
9.2.1 Prezența ulcerației.....	105
9.2.2. Distribuția pacienților în funcție de grosimea tumorală (indicele Breslow) și nivelul de invazie Clark.....	107
9.2.3. Distribuția lotului studiat în funcție de rata mitotică.....	108
9.2.4. Regresia tumorală în studiul efectuat.....	108
9.3 Studiul imunohistochimic al MM cu regresie tumorală.....	110
9.3.1. Studiul imunohistochimic al celulelor dendritice în lotul studiat.....	110
9.3.2. Distribuția celulelor CD4+, CD8+ MM cu regresie.....	112

9.3.3. Distribuția celulelor FOXP3 în MM cu regresie.....	112
9.3.4 Distribuția celulelor CEACAM1, MMP-uri și TIMP-uri în MM cu regresie	114
CONCLUZII.....	121
BIBLIOGRAFIE.....	124
Anexa 1.....	146

INTRODUCERE

Melanomul cutanat (MC) este o tumoră cutanată agresivă care poate prezenta un fenomen rar în absența tratamentului: regresia spontană, definită ca dispariția completă sau parțială a celulelor maligne. Deși mecanismele de regresie în melanom nu sunt complet înțelese, cunoștințele actuale afirmă că sistemul imunitar gazdă are un rol cheie în acest proces, caracterizat histologic printr-o zonă intratumorală în care proliferarea malignă este, parțial sau complet, înlocuită de celule inflamatorii, hiperplazie vasculară și fibroză. Regresia este descrisă în 10-35% din melanoame și este dificil de apreciat semnificația prognosticului. Unele studii sugerează că este un eveniment sinistru, probabil legat de efectul de îmbunătățire pe care inflamația cronică îl are asupra tumorigenezei. Cu toate acestea, acest proces imunitar este baza imunoterapiei în melanom cu rezultate pozitive evidente .

Se știe că limfocitele T citotoxice, CD8+, sunt celule ce acționează ca și efectori primari în răspunsul antitumoral al gazdei, dar interacțiunea dintre sistemul imun al gazdei și celulele tumorale din melanom este complexă și incomplet înțeleasă. Studiile efectuate până în prezent, care au deslușit patogeneza regresiei tumorale în melanoma, au condus la identificarea unor noi terapii și dezvoltarea unor inhibitori imuni cheie pentru managementul melanomului avansat. Noile tehnici de studiere a micromediului tumoral pot conduce la o aprofundare în studiul imun al regresie melanomului malign, ceea ce va dezvolta noi factori de prognostic și predicție.

De-a lungul timpului, studiile efectuate pentru regresia tumorală ca și factor de prognostic în melanom au avut rezultate conflictuale , până în prezent fiind raportate multe clasificări ale acesteia, unele opinii calificând-o ca și factor de prognostic favorabil, în timp ce altele o încredrează ca și factor de prognostic negativ. Regrsia se pare ca are o influență scăzută asupra comportamentului biologic al melanomului, dar are o anumita importanță în gradarea agresivității melanomului.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Melanomul malign: date generale

Melanomul malign este o proliferare tumorală malignă, cel mai frecvent dezvoltată la nivelul pielii, cu origine în melanocite, celulele ce conțin pigment melanic. Această tumoră are o rată a incidenței în creștere mult mai mare comparativ cu celelalte malignități. MM este cea mai agresivă tumoră malignă cutanată, fiind a cincea cea mai frecventă tumoră diagnosticată în Statele Unite, cu o creștere masivă în rândul populației cu piele deschisă la culoare. Cea mai mare problemă a creșterii incidenței melanomului este faptul că aceasta începe să fie mai ridicată în rândul populației tinere, comparative cu alte malignități.

Anual, peste 300000 de persoane mor din cauza MM. O creștere anuală a incidenței cazurilor de MM atrage după sine o creștere a ratei de mortalitate. Rata mortalității la bărbați a avut o creștere semnificativă în ultimii ani de la 2,3/100000 locuitori în anii '80 la 5/100000 locuitori în anii 2000, fiind mult mai ridicată comparativ cu cea a femeilor: de la 2,2/100000 locuitori în anii '80 la 2,9/100000 locuitori în anii 2000

Rata de supraviețuire reprezintă perioada de timp în care un pacient diagnosticat și tratat cu o malignitate trăiește și se măsoară într-un interval de timp de 5 sau 10 ani. În cazul MM rata de supraviețuire depinde de anumiți factori: localizare, stadiu, prezența metastazelor. Astfel, în stadiile I-II supraviețuirea la 5 ani este de 99,4%, pentru stadiul III de 68% iar pentru stadiul IV de numai 29,8%.

Stadiu	Breslow	Supraviețuirea la 5 ani
	In situ	90-100%
I	< 1mm	80-90%
II	1-2mm	70-80%
III	2,1-4mm	60-70%
IV	>4mm	50%

Tabel 1 Supraviețuirea la 5 ani în funcție de indicele Breslow

2. Factorii de risc

Un factor foarte important în dezvoltarea melanomului malign cutanat este reprezentat de **expunerea prelungită la soare**. MM se dezvoltă atunci când AND-ul din celulele tegumentului (melanocitele) este distrus, cel mai frecvent, sub acțiunea radiațiilor ultraviolet ce conduce la mutații sau alterări genetice, făcând ca melanocitele muante să se înmulțească rapid, rezultând melanomul malign.

Mutațiile BRAF sunt întâlnite mai frecvent la pacienții tineri ce prezintă mulți nevi melanocitari și istoric de expunere la soare și aceia cu melanom extensive în suprafață (SSM). Mutațiile produse la nivelul oncogenelor KIT sunt prezente în peste 20% din cazurile de melanom acral lentiginos (ALM) și cele mucosale. Mutațiile induse de UV la nivelul genei supresoare p53 se observă frecvent la pacienții cu MM în stadiul IV, având un prognostic rezervat.

Anual, peste 7,8 milioane de femei și peste 1,9 milioane de bărbați folosesc **aparatele de bronzare**, ale căror radiații UVA și UVB sunt mult mai crescute decât cele ale soarelui, ceea ce face să crească riscul de apariție a melanomului malign. Cel mai frecvent, folosirea solarelor pentru bronzare determină apariția de melanomului, nevi atipici și elstoză solară la nivelul membrului inferior. Studiile efectuate asupra riscurilor de expunere la radiațiile UV de la aparatele de bronzare au determinat pe cei din Comitetul științific pentru sănătate, mediu și riscuri emergente al Comisiei Europene și OMS să afirme că nu există limită sigură pentru expunerea la acestea.

Unul dintre factori de risc pentru dezvoltarea melanomului malign îl reprezintă prezența **nevilor melanocitari**, 25% dintre acesta dezvoltându-se pe leziuni nevice preexistente. Riscul de dezvoltare a MM depinde de numărul, tipul și dimensiunea nevilor. Unele studii arată ca persoanele cu peste 100 de leziuni nevice au un risc de 7 ori mai mare să dezvolte MM. Ghidurile actuale recomandă rezecția cu limite de 2 mm pentru efelide dacă acestea prezintă criterii ca asimetrie, margini neregulate, variații de culoare, diametrul de peste 6 mm și dacă au evoluat rapid (criterii ABCDE).

Un factor de risc important în dezvoltarea MM este **istoriul familial**. Studiile au demonstrat că familiile cu melanom moștenit au un model de transmitere autosomal-dominant, mutațiile fiind frecvent întâlnite la nivelul genei CDKN2A sau p16.

Cel mai frecvent MM se asociază cu **obezitatea** la pacienții cu ICM peste 30. Prin semnal melatobolic, țesutul adipos în exces se pare că induce hiperactivitate la nivelul oncogenei BRAFV600E

3. Leziuni precursorare

În general, carcinogeneza unei malignități implică leziuni intermediare, care se regăsesc între malign și benign. Aceste leziuni nu au evoluție obligatorie către malignitate, dar prezintă un risc de a se transforma malign

Leziunile care ar putea duce la dezvoltarea melanomului malign sunt:

- *nevii melanocitari* (nevi donândiți, nevi atipici și displazici): melanomul malign se poate dezvolta pe oricare dintre nevii melanocitari, dar acesta apare de obicei pe pielea sănătoasă. Cel mai frecvent, MM se dezvoltă pe nevii melanocitari comuni (56,7%), iar pe nevii displazici 43,3%. Un individ cu un număr mare de nevi melanocitari are risc mai crescut de a dezvolta MM.

- *nevii melanocitari congenitali*: riscul de a dezvolta MM pe NMC este cuprins între 0,1 și 5%. Riscul depinde de dimensiunea nevelui congenital, astfel că nevii congenitali cu dimensiuni foarte mari au risc mai mare de a se transforma malign, între 2 și 5%. Pe aceste tipuri de leziuni, MM tinde să se dezvolte devreme în viața individului, vârsta medie fiind de 15,5 ani [42].

- *lentigo solar și xeroderma pigmentosum*: XP este un important factor de risc pentru dezvoltarea MM, această fiind o boală rară cu transmitere autosomal recisivă, în care individual are un deficit la nivelul nucleotidelor de reparare după distrugerea de către UVA și UVB.

4. Criterii de diagnostic clinic, clasificare, histopatologia și imunohistochimia melanomului malign

Cea mai importantă metodă de diagnostic în MM rămâne diagnosticul histopatologic, care, în asociere cu caracteristicile clinice, este și metoda principală de clasificare. MM este diagnosticat incidental sau după apariția simptomatologiei, care include apariția unui nodul subcutanat, prurit, sângerare sau apariția de cruste la nivelul unei leziuni pigmentate preexistente. Până la apariția simptomatologiei, ce apare după progresia tumorii și apariția inflamației, MM este complet asimptomatic. Anamneza unui pacient suspect de MM ar

trebuie să includă întrebări despre trecutul medical (alte malignități ale pielii), expunerea la soare, arsuri solare ale pielii, bronare în saloanele special, istoric familial de MM.

Regula ABCDE reprezintă caracteristicile formațiunii tumorale tegumentare. Unele studii arată că această metodă de diagnostic are o sensibilitate de 91,6% și o specificitate de 60,4 %. Acestea sunt:

- asimetrie
- B – marginile tumorii (border)
- C - culoare
- D – diametrul
- E – evoluție (un criteriu mai recent ce apreciază evoluția tumorii)

Clasificarea TNM este un element important în diagnosticul MM atât pentru prognosticul pacientului cât și tratamentul și cercetarea acestuia. Clasificarea Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) din 2018 a MM îl clasează pe acesta ca fiind o entitate biologică independentă, cu caracteristici clinice, histopatologice și genomice diferite. Noua clasificare a MM cuprinde 9 căi distincte de dezvoltare a acestuia, ținând cont de clinică, aspectul histopatologic, epidemiologie și genomica acestuia.

Noua clasificare a leziunilor melanocitare are la bază influența radiațiilor UV, originea tumorii (punctul de plecare al tumorii) și caracteristicile genetice. Pentru a grada distrugerile cumulative provocate de soare din punct de vedere histologic se folosește termenul de elastoă solară. În cele mai multe țări, MM se dezvoltă pe tegumentul ce este expus la soare, o perioadă mai îndelungată sau nu, existând un număr mai mic de MM care nu au legătură cu expunerea la soare.

Melanoame asociate cu expunerea la soare	Melanoame independente de expunerea la soare
Melanoam extensiv în suprafață/ melanom low -CSD	Melanom Spitz
Lentigo maligna melanoma/melanom high-CSD	Melanom acral
Melanom desmoplazic	Melanom mucosal
	Melanom dezvoltat pe nev congenital
	Melanom dezvoltat pe nev albastru
	Melanom uveal
Melanomul nodular poate să apară prin oricare dintre căile de mai sus	

Tabel 2. Clasificarea melanomelor în funcție de modul de dezvoltare

5. Factorii de prognostic în melanomul malign

În momentul actual prognosticul pacientului cu MM depinde de stadiul clinic corelat cu cel histopatologic. Stadiul clinic este stabilit de o corelație dintre aspectul histopatologic, clinica pacientului, imagistica și analizele de laborator, care, împreună, satbilesc prezența sau absența metastazelor. Corelarea corectă între factorii de pronostic și stadiul clinic este foarte important pentru tratamentul și urmărirea ulterioară a pacientului, cât și pentru dezvoltarea de noi strategii.

Factorii de pronostic clinici sunt reprezentați de vârsta și sexul pacientului, tipul de piele al individului și localizarea anatomică a tumorii.

Cei mai importanți **factori de pronostic histopatologic** sunt reprezentați de grosimea tumorală (Breslow), ulcerarea, prezența nodulilor microsatelitari și numărul de mitoze. Alți factori de pronostic, mai puțin importanți, dar care ar trebui raportați în raportul histopatologic sunt: infiltratul inflamaor limfocitar intra sau peritumoral, invazia limfo-vasculară și perineurală, regresia și nivelul de invazie (nivelul Clark).

6. Regresia tumorală în melanomul malign

Regresia tumorală este un proces imun care duce la dispariția totală sau parțială a proliferării tumorale. Ca și alte tumori, și MM poate prezenta regresie tumorală spontană, un fenomen ce poate crea probleme de diagnostic clinic și histopatologic, deoarece au fost raportate în literatura de specialitate cazuri în care pacieții s-au preznetat cu metastaze din MM fără evidența clară a tumorii primare. Din punct de vedere histopatologic, regresia tumorală poate fi absentă, parțială, segmentară și completă. Regresia tumorală este un fenomen daatorat sistemului imuno care distruge celule tumorale prin intermediul limfocitelor. Datorită asocierii cu infiltrat inflamator intratumoral și a capacității de regresie tumorală spontană, MM este considerat o tumoră imunogenică .

Fenomenul de regresie tumorală în MM este unul fregvent întâlnit în acest tip de tumoare, cu o incidență cuprinsă între 10-35% din totalul tumorilor raportate. La ora actuală nu există un consens în ceea ce privește valoarea prognostică a regresiei tumorale spontane în melanom, deoarece unele studii arată că aceasta este un factor de prognostic nefavorabil pentru că unii pacienți cu MM se prezintă cu boală metastatică și absența

tumorii primare, alte studii prezența regresiei nu se asociază cu limfonoduli santinelă pozitivi. Din acest motiv, în momentul de față, regresia nu poate fi încadrată ca factor de pronostic favorabil sau nefavorabil.

CONTRIBUȚII PERSONALE

7. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

Deși datele din literatura de specialitate acordă semnificație majoră cu prognostic pozitiv răspunsului imun în malignitățile altor organe, în MM complet regresat importanța prognostică a răspunsului imun este controversată, cei mai mulți autori considerând că are prognostic nefavorabil, ca urmare a prezentei unor cazuri raportate în literatura de pacienți cu metastaze limfoganglionare și/sau viscerale cu regresie completă a tumorii cutanate

Această lucrare își propune să investigheze din punct de vedere histopatologic și imunohistochimic prezența unor posibili indicatori prognostici, în scopul corelării regresiei tumorale cu un prognostic în MM. O parte din activitatea de cercetare s-a concretizat sub forma a două articole științifice publicate în reviste de specialitate indexate ISI sau PubMed

Obiectivul general al tezei de doctorat constă în identificarea indicatorilor morfologici și imunohistochimici cu valoare diagnostică și prognostică în melanomul malign cu regresie tumorală. Pentru îndeplinirea obiectivului propus, cercetarea urmărește mai multe etape:

- investigarea imunofenotipului celulelor dendritice în infiltratul inflamator din ariile de regresie tumorală comparativ cu cel din ariile non-regresate
- corelarea prezenței și a preponderenței celulelor dendritice din infiltratul inflamator din ariile de regresie ale melanomului malign și din ariile cu infiltrat inflamator din zonele non-regresate
- evaluarea infiltratului inflamator limfocitar din ariile de regresie tumorală și ariile non-regresate ale tumorii
- corelarea dintre prezența celulelor dendritice și a infiltratului inflamator alcătuit din limfocite T
- prezența markerilor de adeziune moleculară, inhibitori ai matricei metaloproteinazelor și metaloproteinaze și rolul acestora în ariile de regresie tumorală și zone de non-regresate.

Ne așteptăm ca datele cercetării să demonstreze că regresia tumorală este un factor pe pronostic favorabil în evoluția melanomului malign. Infiltratul inflamator din zonele de regresie are o componentă particulară față de infiltratul inflamator intratumoral din MM fără arii de regresie și depinde de expresia unor factori de semnalizare în melanocitele tumorale din vecinătate. Multe dintre studiile efectuate până în prezent sunt în contradictoriu, unele susținând ca regresia tumorală în melanomul malign are un prognostic bun, altele că regresia este un factor de prognostic nefavorabil.

8. Metodologia generală a cercetării

În vederea îndeplinirii obiectivelor menționate anterior, am organizat prezentul studiu sub forma unei cercetări retrospective de tip cohortă realizată pe pacienții la care s-a practicat excizia de fragmente cutanate ce prezentau leziuni melanocitare de tipul MM în secțiunile de chirurgie plastică și dermatovenerologie ale Spitalului Clinic Colentina, într-un interval de șapte ani (2009 - 2016).

Materialul examinat a constat din fragmente de tegument cu tumoră, prelevate, în cursul orientării macroscopice, din piesele cutanate primite în Serviciul de Anatomie Patologică al aceluiași spital. Acestea au fost prelucrate de rutină conform protocoalelor interne și au beneficiat de un diagnostic histopatologic complet la scurt timp după intervenția chirurgicală.

Selecția retrospectivă a cazurilor s-a făcut accesând baza de date informatizată a Departamentului de Anatomie Patologică a Spitalului Clinic Colentina. Au fost verificate suplimentar anexele din fișa de însoțire a materialului biologic prelevat de la pacienți, în care aceștia își exprimă acordul inclusiv în ceea ce privește utilizarea în scop științific a fragmentelor tisulare excizate chirurgical.

Lotul inclus în studiu a cuprins un număr de 60 de pacienți selectați consecutiv, cu diagnosticul de melanom malign cu arii de regresie tumorală confirmat microscopic. Din piesele rezultate în urma selecției cazurilor au fost împărțite în două grupuri: grupul cu zone din ariile de regresie tumorală și zone din tumora de la același pacient, rezultând astfel 120 de probe.

Din blocurile selectate s-au extras fragmentele de interes (zonele cu regresie tumorală și fragmente din tumoare, fără regresie tumorală) și au fost incluse în blocuri multitisulare. Din noile blocuri de parafină multitisulare s-au efectuat secțiuni la de 3μ

pentru colorații uzuale și de 2μ pentru cele imunohistochimice, care au fost etalate pe lame simple și uscate 2 ore la termostat. Ulterior, acestea au fost deparafinate în xilen, rehidratate în soluții de etanol cu concentrație crescândă și apoi în apă și colorate cu colorațiile hematoxină-eozină conform rețetei laboratorului

Toate cazurile studiului au beneficiat de o analiză imunohistochimică completă, utilizând un panel alcătuit din nouăsprezece markeri imunohistochimici. Aceștia au cuprins markeri pentru obiectivarea infiltratului inflamator alcătuit din limfocite T citotoxice (CD4, CD8, FOXP3).

Pentru celulele dendritice din infiltratul inflamator din ariile de regresie, cât și din zonele tumorale non regresate, s-au folosit markeri imunohistochimici precum CD1a, CD11c, Langerin.

S-a evaluat prin teste imunohistochimice prezența markerilor de adeziune moleculară (CEACAM1), inhibitori ai matricei metaloproteinazelor și metaloproteinaze și rolul acestora în ariile de regresie tumorală și zone de non-regresate (TIMP1; TIMP2, TIMP3, MMP1, MMP2, MMP3, MMP9)

Pentru început am preluat din rezultatul histopatologic al fiecărui pacient datele legate de vârsta și sexul acestuia, tipul de melanom malign, indicele Breslow, nivelul de invazie Clark, numărul de mitoze pe mm², prezența sau absența ulcerăției și localizarea. Toate melanoamele încadrate în studiu au fost extensive în suprafață.

Vârstele pacienților au fost grupate în 3 categorii astfel: între 20-40 ani; între 41- 60 ani și 61-90 ani, de asemenea și numărul de mitoze: între 1-5 mitoze, 6-10 mitoze, peste 11 mitoze. Absența mitozelor a creat un grup separat.

Localizarea anatomică a tumorii a fost grupată în 5 categorii: cap și gât, trunchi, membre inferioare, membre superioare și fără localizare (localizarea anatomică nu a putut fi extrasă din biletelul de însoțire al materialului biopsic).

În studiu au fost incluse numai cazuri cu regresie segmentară și parțială, aceasta fiind clasificată în arii de regresie peste 75% din suprafața tumorii și arii de regresie tumorală sub 75% din suprafața tumorii.

Prezența limfocitelor T, CD4 și CD8, a fost scorificată astfel: scor 0 – absente, scor 1 – rare, scor 2 – număr moderat, scor 3 – frecvente scor 4 – foarte frecvente.

În celulele limfatice infiltrante s-a evaluat numărul de celule pozitive FOXP3, atât în zonele regresate, cât și în cele neregresate, după cum urmează: rare (<20%), frecvente (între 20% și 80%) și foarte frecvente (>20%) .

Celulele dendritice au fost evaluate pe colorația CD1a, CD11c, Langerin, folosind o scară semicantitativă (0 – absent, 1 – rar, 2 – frecvent, 3 – foarte frecvent), fiind descrise în zone regresate și neregresate.

Prezența celulelor care au exprimat markeri CEACAM1, MMP și TIMP a fost cuantificată pe o scară semicantitativă: 0 – absent, 1 – pozitivitate slabă, 2 – pozitivitate moderată și 3 – pozitivitate intensă.

Pentru analiza statistică a datelor am folosit programele Microsoft Excel și SPSS versiunea 19, alegând parametri obișnuiți de semnificație statistică ($p < 0,05$ și interval de încredere de 95%). Am folosit atât variabile categorice cât și variabile continue și am precizat, pe parcursul lucrării, funcțiile statistice folosite. Pentru descrierea grupurilor am folosit media; pentru compararea a două grupuri am folosit testul t Student și testul Fisher.

9. Rezultate

Date demografice despre lotul studiat:

Lotul de pacienți studiați cuprinde 32 de femei și 28 de bărbați, raportul dintre sexe fiind de 1,14:1 în favoarea femeilor. Aceste date nu concordă cu datele din literatură, care raportează o prevalență mai crescută în rândul bărbaților, în acest studiu semnificația statistică fiind nulă. În funcție de sex, incidența MM este mai crescută în rândul bărbaților, aceasta fiind de 3,8/100000 locuitori, la femei fiind de 3/100000 locuitori, cu un risc de dezvoltare a acestei malignități de 0,42% la bărbați, respective 0,33 % la femei. Se pare că până la vârsta de 50 de ani femeile au o incidență mai crescută a MM, dar după vârsta de 60 de ani, incidența crește în rândul bărbaților, aceștia având o rată de supraviețuire mai scăzută decât cea a femeilor, ceea ce depinde de anumiți factori biologici.

Datele obținute corespund cu prevalența generală a bolii, care este mai frecventă la pacienții peste 41 de ani, ceea ce reprezintă peste jumătate din pacienții incluși în studiu.

Corelația dintre vârstă și sex este una fără semnificație statistică în acest studiu, vârstele medii de diagnosticare a MM fiind similare, astfel că, vârsta medie, la bărbați diagnosticați cu MM din acest studiu a fost de 61,35 de ani, iar la femei de 60,90 ani.

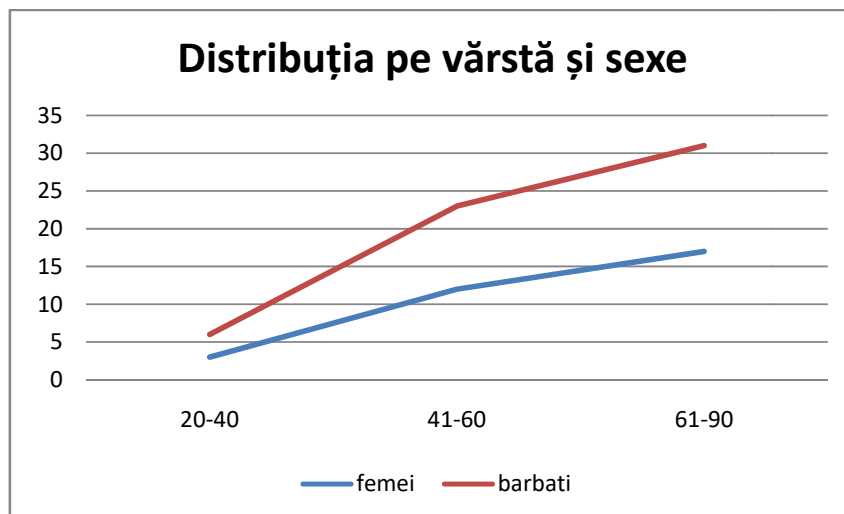


Fig.1 Corelația dintre grupele de vârstă și sexe

Corelația dintre vârstă și indicele Breslow, cel mai important factor de pronostic în MM, nu a avut valoare semnificativ statistică decât pentru grupul de vârstă 20-40 de ani, unde acesta a avut cea mai mică valoare (t-test, $p < 0.032$). Cum era de așteptat, indicele Breslow a fost semnificativ mai mare la pacienții peste 40 de ani comparativ cu cei cu vârste cuprinse între 20-40 de ani.

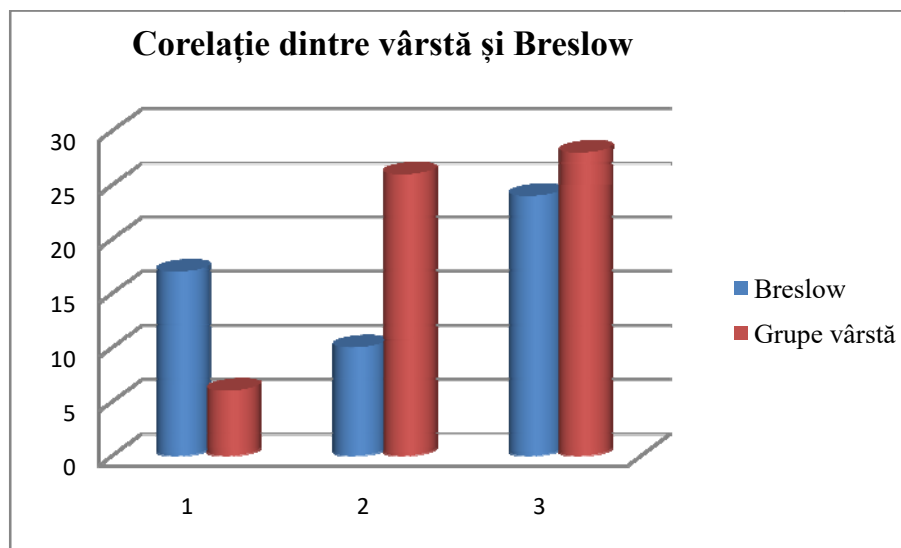


Fig. 2 Distribuția pacienților în funcție de vârstă și breslow

Din studiul efectuat, rezultă că pacienții mai vârstnici au o evoluție mai rapidă a bolii, în funcție de indicele Breslow, ceea ce conduce la concluzia că vârsta pacientului cu MM este un factor de pronostic important în evoluția MM.

În studiul efectuat, corelația dintre sexe și indicele Breslow a fost una cu valoare semnificativ statistică (t-test, $p < 0.0006$)

Date morfologice și clinice

Corelațiile dintre sex și localizare și vârstă și localizare în lotul studiat sunt fără valoare semnificativ statistică, dar s-a observat o localizare preponderentă la nivelul trunchiului atât la femei cât și la bărbați.

Ulcerația MM este un factor de pronostic negativ. Rata de supraviețuire la cinci ani este redusă de la 80% pentru melanoamele neulcerate la 55% în prezența ulcerației pentru pacienții cu melanom în stadiul I și de la 53 la 12% pentru pacienții cu melanom în stadiul II.

Se pare că melanoamele cu ulcerație prezentă au un indice Breslow mai crescut, cu o grosime tumorală medie de 3,47 mm, în timp ce melanoamele mai subțiri, cu o grosime tumorală medie de 1,23 mm, nu au prezentat ulcerație

În grupul nostru de melanoame cu regresie, indicele Breslow a variat între 0,15 mm și 11,4 mm, valoarea medie de 2,57 mm. Din totalul lotului examinat doar 17 au grosimea tumorală sub 1 mm (melanoame subțiri), cele mai multe dintre ele având o grosime peste 2 mm.

Actuala stadializare a MM se bazează pe sistemul de stadializare AJCC (American Joint Committee on Cancer), implementat în anul 2018, luna ianuarie, în Statele Unite. Stadializarea se bazează pe clasificarea TNM (T-tumoare, N-noduli, M- metastaze). Categoria tumorii este determinată în funcție de grosimea tumorii – indicele Breslow și de prezența sau absența ulcerației

Tumora primară [T]	Breslow [mm]
pTis	melanom malign in situ
pT1 ●pT1a ●pT1b	dimensiunea maximă a tumorii 1mm ● tumoră cu dimensiuni < 1mm fără ulcerație ● tumoră cu dimensiuni cuprinse între 0,8-1 mm fără ulcerație sau ● tumoră cu dimensiuni > 0,8 mm cu ulcerație
pT2 ●pT2a ●pT2b	tumoră cu dimensiuni cuprinse între 1-2 mm ● tumoră cu dimensiuni cuprinse între 1-2 mm fără ulcerație ● tumoră cu dimensiuni cuprinse între 1-2 mm fără ulcerație
pT3 ●pT3a ●pT3b	tumoră cu dimensiuni cuprinse între 2-4 mm ● tumoră cu dimensiuni cuprinse între 2-4 mm fără ulcerație ● tumoră cu dimensiuni cuprinse între 2-4 mm fără ulcerație
pT4 ●pT4a ●pT4b	tumoră cu dimensiuni > 4 mm ● tumoră cu dimensiuni > 4 mm fără ulcerație ● tumoră cu dimensiuni > 4 mm fără ulcerație

Tabel 3. Stadializarea tumorii corelat cu indicele Breslow

Rata mitotică a fost între 1 și 20 de mitoze/1 mm², cu un indice mitotic mediu de 4,56 mitoze/mm². După cum era de așteptat, a existat o corelație foarte puternică între indicele mitotic și Breslow (testul t, valoarea P tow tail 0,002).

Majoritatea studiilor efectuate asupra factorilor de pronostic în MM au descoperit că nivelul de invazie Clark nu are nicio semnificație prognostică, după ce indicele Breslow a fost luat în considerare prin analize multivariate.

Nivelul de invazie Clark are 5 etape, detaliate în tabelul următor.

Clark	Nivel de invazie
Clark I	●se mai numește și melanom in situ – celulele melanomului se află doar în epiderm
Clark II	●prezența de celule de melanom în stratul dermul superficial
Clark III	●prezența de celule melanocitare maligne în dermul profund
Clark IV	●înseamnă că melanomul s-a răspândit în dermul reticular
Clark V	●înseamnă că melanomul a invadat hipodermul

Tabel 4 Nivelul de invazie Clark

Regresia tumorală spontană în melanomul malign are loc într-o proporție mică de melanoame maligne și este important să înțelegem procesele implicate în inducerea acestuia, deoarece aceasta poate oferi un ghid pentru terapiile viitoare pentru această boală.

Distribuția lotului în funcție de prezența regresiei și indicele Clark nu indică diferențe semnificative. Distribuția lotului în funcție de prezența regresiei și index-ul mitotic nu indică diferențe semnificative (P 0.70), nici în ceea ce privește prezența ulcerăției.

Markerii imunohistochimice în ariile de regresie tumorală corelații cu ariile nonregresate.

Diferența dintre frecvența CD CD1a+ în zonele regresate și cele neregresate este semnificativă statistic (two-tailed P value=0.04).

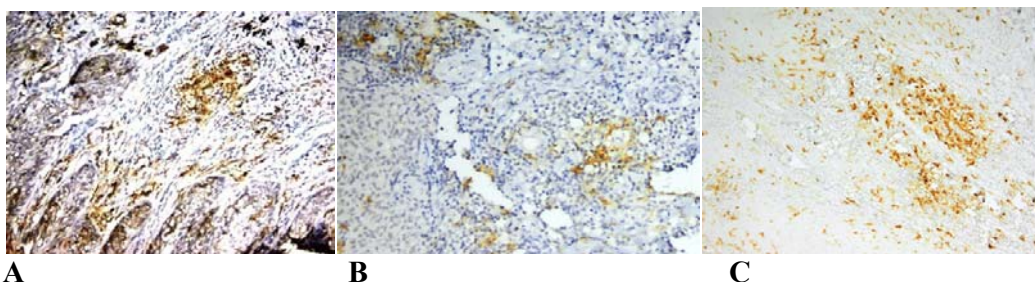


Fig. 3 Distribuția celulelor dendritice: A. Pattern nodular; B. Pattern arahnoidian. C. Pattern difuz; CD1a 100X

În lotul studiat prezența celulelor dendritice pozitive pentru imunomarcajul cu markerul CD11c nu a avut valoare statistică semnificativă în zonele cu regresie comparativ cu zonele non-regresate [two-tailed P value=0.5], dar CD CD11c au fost mai numeroase în ariile de regresie comparativ cu cele non-regresate.

Unele studii au arătat că celulele T CD4 sunt asociate cu regresia în melanomul primar și cu respingerea tumorilor în modelele adoptive de transfer. Mecanismul prin care își mediază efectele antitumorale rămâne neclar, iar unele studii au sugerat că interacțiunile ligand Fas [FasL]/Fas au fost implicate.

După cum era de așteptat, în studiul nostru, celulele CD4 pozitive au fost mai numeroase comparativ cu limfocitele CD8 pozitive. În ariile non-regresate celulele CD8 pozitive au fost mai numeroase comparativ cu cele CD4 pozitive

În celulele limfatice infiltrante s-a evaluat numărul de celule pozitive FOXP3, atât în zonele regresate, cât și în cele neregresate, după cum urmează: rare [$<20\%$], frecvente [între 20% și 80%] și foarte frecvente [$>20\%$]. De asemenea, distribuția limfocitelor pozitive FOXP3 a fost evaluată în zonele de regresie și zonele neregresate.

Expresia FOXP3 în celulele tumorale a fost semnificativă statistic atunci când a fost corelată cu indicele Breslow [*t* test, two-tailed P value $<0,038$]. În tumorile subțiri, FOXP3 a fost predominant negativ sau a avut o expresie ușoară, în timp ce în tumorile mai groase, a existat o expresie mai intensă a FOXP3.

În lotul studiat se pare că celulele CD4 și CD8 pozitive mult diferit comparativ cu pozitivitatea acestora pentru FOXP3, având un raport invers proporțional, în zonele în care celulele FOXP3 au fost numeroase, celulele dendritice au avut un număr redus și invers (*t* test, two-tailed P value <0.00021)

Din totalul cazurilor, în zonele de regresie tumorală CEACAM1 a fost absent în 46 cazuri și slab pozitiv numai în 14 cazuri. În ariile non-regresate 17 cazuri au fost intens pozitive, 14 moderat pozitive, 23 cazuri slab pozitive și 6 negative. Din aceasta rezultă că există o diferență semnificativă între pozitivitatea celulelor restante în ariile de regresie tumorală comparativ cu celulele tumorale din ariile non-regresate

Expresia CEACAM1 în ariile regresate comparativ cu cele non regresate nu prezintă valoare semnificativă statistică, în schimb unele studii au demonstrat că expresia pentru CEACAM1 are valoare semnificativă statistică în melanoamele cu regresie comparativ cu melanoamele fără regresie tumorală (t-test, $p<0.0001$)

Există o pierdere semnificativă a expresiei CEACAM-1 în celulele melanomului din zonele de regresie, ceea ce indică faptul că regresia este nu numai rezultatul

inflamației, ci și al unor caracteristici specifice ale unor celule tumorale care le fac mai sensibile la acțiunea toxică a celulelor limfatice.

În majoritatea cazurilor, atât în zonele regresate, cât și în cele non-regresate, MMP1 a prezentat expresie slab și moderată pozitivă. În ariile de regresie tumorală, MMP1 a avut expresie imunohistochimică astfel: în cele mai multe cazuri (46%) a fost slab pozitiv, în 32% a fost moderat pozitiv, iar în 22% a fost intens pozitiv. În ariile non-regresate 58% din acestea au prezentat pozitivitate intensă pentru MMP1 în celulele tu

MMP-2 a fost pozitiv difuz atât în ariile regresate cât și în cele non regresate. MMP-2 a fost mai intens pozitiv în zonele non-regresate. Cele mai multe cazuri, în ariile de regresie tumorală, expresia lui MMP-2 a fost moderată (53%), urmată de cazurile cu intensitate marcată (32%) și 15% au fost slab pozitive. Comparativ, în ariile non-regresate, cele mai multe cazuri au avut intensitate moderată și cele mai puține au fost slab pozitive, dar nu au existat diferențe semnificative între ariile de regresie tumorală și ariile non-regresate.

MMP-3 a fost difuz pozitiv atât în componenta regresată cât și în cea non-regresată, fără valoare semnificativă între cele două, deși expresia acestuia pare ușor scăzut comparativ cu cea din melanoamele fără regresie.

MMP-11 în studiul nostru a avut expresie ușor diminuată, atât în ariile de regresie tumorală cât și în ariile non-regresate.

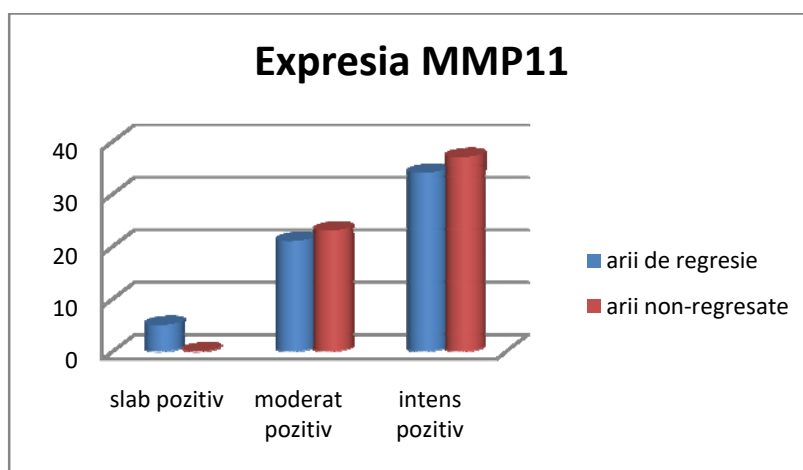


Fig.4 Expresia MMP11 în lotul studiat

În toate cazurile, MMP a avut expresie similară, atât în ariile regresate cât și în ariile non regresate. MMP3 a fost markerul care a prezentat supraexpresie ușor crescută comparativ cu celelalte metaloproteinaze, urmată de supraexpresia MMP-2 și MMP-11, MMP-13 și MMP-1. Fibroblastele stromale tumorale au fost, de asemenea, puțin mai intense pozitive în zonele non-regresate decât în ariile regresate sau au arătat o expresie similară în ambele componente.

MMP2 a fost a avut o expresie mai intensă în fibroblastele din zonele non-regresate comparativ cu cele exprimate în zonele de regresie tumorală (t-test, $p < 0.00033$). MMP13 a fost mai intens exprimat în zonele non-regresate comparativ cu cele regresate (t-test, $p < 0.0006$). În cazul MMP1, MMP3 și MMP 11 nu au existat diferențe semnificative.

Expresia TIMPs a avut o variabilitate mai mare în componenta non-regresată față de componenta regresată a lotului studiat, atât în celulele tumorale, cât și în cele stromale; au existat cazuri de supraexprimare, expresie similară sau expresie diminuată pentru fiecare tip de TIMP investigat. Cu toate acestea, majoritatea cazurilor (60% pentru TIMP-1, 58% pentru TIMP-2 și 63% pentru TIMP-3) au avut supraexpresie TIMP în ariile non-regresate comparativ cu cele regresate.

CONCLUZII

Am efectuat un studiu retrospectiv, de cohortă, incluzând 60 de pacienți consecutivi, diagnosticați cu melanom malign în Serviciul de Anatomie Patologică al Spitalului Clinic Colentina, pe baze clinice și histopatologice. Studiul a urmărit analiza imunohistochimică a unor celule din infiltratul inflamator din ariile cu regresie tumorală comparativ cu ariile non-regresate ale melanomului malign., bazându-se pe evaluarea microscopică.

Analiza comparativă realizată ne-a permis să formulăm o serie de concluzii, dintre care le-am extras pe cele mai importante:

- MM este o afecțiune malignă care afectează în general populația vârstnică, dar poate să apară la orice vârstă, cu o rată de mortalitate încă crescută
- În lotul studiat există o discordanță între numărul de femei și cel de bărbați, fiind incluse în studiu 32 de femei și 28 bărbați. Aceste date nu corespund celor din literatură
- Distribuția pe vârstă a respectat datele din literatură, cei mai mulți pacienți din studiu având o vârstă peste 60 de ani

- În MM grosimea tumorală (Breslow) este un factor de prognostic important, care corelat cu vârsta pacientului, rezultă că o grosime tumorală mai mică (MM subțiri) are o evoluție mai bună
- Localizarea tumorii are un rol important în evoluția MM, tumorile situate la nivelul capului și gâtului având o evoluție mai proastă.
- Distribuția particulară de CD în melanom cu regresie și creșterea numărului de CD în zonele de regresie comparativ cu zonele non-regresate pot indica faptul că CD sunt implicate în fenomen de regresie și poate avea valoare prognostică în melanom. În urma analizei literaturii de specialitate, am observat că rolul celulelor dendritice în melanomul cu regresia a fost slab studiată.
- Caracterizarea CD și înțelegerea comportamentului său va contribui în mod esențial la dezvoltarea de vaccinuri și managementul bolilor de piele.
- Mai interesantă este asocierea modelului de distribuție al celulelor dendritice în zonele de regresie și prezența de celule dendritice în cadrul masei tumorale non-regresat.
- Celulele Langerhans au fost în mod constant asociate cu factori de prognostic favorabil, astfel constituindu-se ca un parametru promitator pentru a fi evaluat în cazul melanoamelor.
- Celulele CD4 pozitive au fost mai numeroase comparativ cu limfocitele CD8 pozitive. În ariile non-regresate celulele CD8 pozitive au fost mai numeroase comparativ cu cele CD4 pozitive.
- FOXP3 este o țintă interesantă și promițătoare a terapiei moleculare, deoarece pare a fi un factor independent de comportament agresiv atunci când este exprimat în celulele tumorale și, de asemenea, este profund implicat în modularea apărării imune a gazdei.
- Regresia tumorală este corelată cu o inhibare a celulelor T de reglementare FOXP3 în prezența unui număr crescut de celule dendritice. Datele sugerează că melanoamele cu un număr mare de celule T reglatoare și un număr scăzut de celule dendritice au un risc mai mare pentru un comportament biologic agresiv.
- O observație interesantă este că intensitatea expresiei FOXP3 a fost mai mare în leziunile care au prezentat un pattern difuz de pozitivitate, în timp ce tumorile care au avut doar pozitivitate focală au avut o intensitate mai mică a expresiei FOXP3
- Anticorpii monoclonali împotriva CEACAM1 pot induce pierderea expresiei CEACAM1 în celulele melanomului și pot spori efectul antitumoral al sistemului imunitar al pacienților. CEACAM1 este o țintă terapeutică promițătoare, deoarece pierderea

expresiei în celulele tumorale pare să stimuleze regresia și să inhibe creșterea verticală și invazia.

➤ CEACAM1 este un marker valoros în melanom care poate fi utilizat pentru o descriere mai completă a caracteristicilor tumorale legate de invazivitate și comportament agresiv. Este mai intens pozitiv în melanoamele groase și în frontul de invazie, indicând că celulele CEACAM1-pozitive au un potențial mai mare de invazie și metastază.

➤ De asemenea, există o pierdere semnificativă a expresiei CEACAM1 în celulele melanomului din zonele de regresie, indicând că regresia nu este doar rezultatul inflamației, ci și al unor caracteristici specifice

➤ Expresia MMP3, MMP11, MMP13, TIMP1, TIMP2 și TIMP3 este diminuată în ariile cu regresie față de cele neregresate. Aceste caracteristici imunofenotipice indică existența unui polimorfism intratumoral, regresia fiind expresia heterogenității intratumorale.

➤ Pe de altă parte, deși rezultatele obținute nu au avut semnificație statistică pentru fiecare marker în parte, am identificat o diminuare a expresiei MMP1, MMP11, TIMP1, TIMP2 și TIMP3, pentru aceste cazuri existând un comportament biologic mai puțin agresiv ale melanoamelor cu regresie tumorală.

➤ TIMP3 a fost supraexprimat în toate cazurile zonele non-regresate în comparație cu componenta regresată.

➤ A fost evidentă o tendință de supraexprimare a TIMP1 și TIMP2 în ariile non-regresate ale melanoamele comparativ cu ariile regresate.

➤ Aceste constatări susțin ipoteza că diferențele morfologice identificate în spectrul de regresie a melanomului se pot corela cu prognosticul, explicând astfel descoperirile controversate din literatura de specialitate privind rolul biologic și prognostic al regresiei.

➤ MMP-urile și TIMP-urile sunt molecule importante implicate în dezvoltarea, progresia și metastazele tumorale cu activitate pro- și antitumorală.

➤ Corelația lor cu regresia în melanom arată: (a) componentele regresate și neregresate sunt de fapt subclone tumorale diferite și (b) în unele cazuri de melanom cu regresie (cu o morfologie specifică), agresivitatea biologică a tumorii și implicit prognosticul general pot fi mai favorabile decât cel al melanomului fără regresie, oferind astfel posibilitatea unei stratificări suplimentare a acestor pacienți dincolo de stadializarea AJCC.

➤ Sunt necesare mai multe studii pentru a stabili căi cuprinzătoare ca poartă pentru identificarea de noi biomarkeri în scopuri diagnostice sau terapeutice

Datele cercetării să demonstreze că regresia tumorală este un factor pe pronostic favorabil în evoluția melanomului malign. Infiltratul inflamator din zonele de regresie are o componență particulară față de infiltratul inflamator intratumoral din MM fără arii de regresie și depinde de expresia unor factori de semnalizare în melanocitele tumorale din vecinătate. Multe dintre studiile efectuate până în prezent sunt în contradictoriu, unele susținând ca regresia tumorală în melanomul malign are un prognostic bun, altele că regresia este un factor de prognostic nefavorabil.

Datele noastre actuale corelate cu studiile anterioare despre diversitatea regresiei în melanom (atât ca aspect morfologic, infiltrarea celulelor imune și imunofenotipul celulelor tumorale), coroborate cu opiniile divergente despre semnificația prognostică a regresiei indică faptul că există o categorie identificabilă de melanoame cu regresie cu prognostic favorabil și, în plus, predispus tratament specific.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Khosravi H., Akabane A. L., Alloo A., Nazarian R. M., Boland G. M. Metastatic melanoma with spontaneous complete regression of a thick primary lesion. *JAAD Case Reports*. 2016;2(6):439–441. doi: 10.1016/j.jdc.2016.09.011.
2. Zurac S. A., Neagu M., Constantin C., et al. Variations in the expression of TIMP1, TIMP2 and TIMP3 in cutaneous melanoma with regression and their possible function as prognostic predictors. *Oncology Letters*. 2016;11(5):3354–3360. doi: 10.3892/ol.2016.4391.
3. Dumitru C., Alexandra B., Cristiana P., et al. Immunohistochemical features of partial regression in cutaneous melanoma-E-cadherin key molecule. *Human and Veterinary Medicine*. 2017;9(1):166–177. [Google Scholar]
4. Blessing K., McLaren K. M. Histological regression in primary cutaneous melanoma: recognition, prevalence and significance. *Histopathology*. 1992;20(4):315–322. doi: 10.1111/j.1365-2559.1992.tb00988.x.
5. Teulings H.-E., Tjin E. P. M., Willemsen K. J., et al. Anti-Melanoma immunity and local regression of cutaneous metastases in melanoma patients treated with monobenzone

- and imiquimod; a phase 2 a trial. *Oncoimmunology*. 2017;7(4, article e1419113) doi: 10.1080/2162402X.2017.1419113.
6. Neagu M., Constantin C., Dumitrascu G. R., et al. Inflammation markers in cutaneous melanoma - edgy biomarkers for prognosis. *Discoveries*. 2015;3(1, article e38) doi: 10.15190/d.2015.30. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
7. Jaitley S, Saraswathi T. Pathophysiology of Langerhans cells. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012 May;16(2):239-44. doi: 10.4103/0973-029X.99077. PMID: 22923897; PMCID: PMC3424941.
8. Rimal R, Muduli S, Desai P, Marquez AB, Möller M, Platzman I, Spatz J, Singh S. Vascularized 3D Human Skin Models in the Forefront of Dermatological Research. *Adv Healthc Mater*. 2024 Apr;13(9):e2303351. doi: 10.1002/adhm.202303351. Epub 2024 Feb 1. PMID: 38277705.
9. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of Melanoma. *Med Sci (Basel)*. 2021 Oct 20;9(4):63. doi: 10.3390/medsci9040063. PMID: 34698235; PMCID: PMC8544364.
10. SEER*Explorer: An interactive website for SEER cancer statistics [Internet]. Surveillance Research Program, National Cancer Institute; 2024 Apr 17. [updated: 2024 Jun 27; cited 2024 Jul 17]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/>. Data source(s): SEER Incidence Data, November 2023 Submission (1975-2021), SEER 22 registries. U.S. Mortality Data (1969-2022), National Center for Health Statistics, CDC.
11. MEMON, Anjum, et al. Changing epidemiology and age-specific incidence of cutaneous malignant melanoma in England: An analysis of the national cancer registration data by age, gender and anatomical site, 1981–2018. *The Lancet Regional Health–Europe*, 2021, 2.
12. <https://www.curemelanoma.org/about-melanoma/melanoma-staging/melanoma-survival-rates>
13. Raimondi S, Suppa M, Gandini S. Melanoma Epidemiology and Sun Exposure. *Acta Derm Venereol*. 2020 Jun 3;100(11):adv00136. doi: 10.2340/00015555-3491. PMID: 32346751; PMCID: PMC9189754.
14. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*. 2014 Nov-Dec;28(6):1005-11. PMID: 25398793.

15. Toussi A, Mans N, Welborn J, Kiuru M. Germline mutations predisposing to melanoma. *J Cutan Pathol.* 2020 Jul;47(7):606-616. doi: 10.1111/cup.13689. Epub 2020 May 11. PMID: 32249949; PMCID: PMC8232041.
16. Flint ND, Bishop MD, Smart TC, Strunck JL, Boucher KM, Grossman D, Secret AM. Low accuracy of self-reported family history of melanoma in high-risk patients. *Fam Cancer.* 2021 Jan;20(1):41-48. doi: 10.1007/s10689-020-00187-0. PMID: 32436000.
17. https://www.researchgate.net/publication/334727429_Acquired_Precursor_Lesions_and_Phenotypic_Markers_of_Increased_Risk_for_Cutaneous_Melanoma Acquired Precursor Lesions and Phenotypic Markers of Increased Risk for Cutaneous Melanoma January 2019 DOI:10.1007/978-3-319-46029-1_8-1 In book: *Cutaneous Melanoma* (pp.1-24)
18. Morton DL, Essner R, Kirkwood JM, et al. Precursor Lesions. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine.* 6th edition.
19. Zurac, Sabina, et al. "Spectrum of morphologic alterations of regression in cutaneous melanoma-potential for improving disease prognosis." *Rom J Intern Med* 50.2 (2012): 145-20.
20. Neagu M. The immune system - a hidden treasure for biomarker discovery in cutaneous melanoma. *Adv Clin Chem.* 2012;58:89–140. doi: 10.1016/B978-0-12-394383-5.00011-4.
21. Mastalier Manolescu BS, Lazar AM, Țiplica GS, Zurac SA, Reboșapcă A, Andreescu B, Popp CG. MMP1, MMP9, MMP11 and MMP13 in melanoma and its metastasis - key points in understanding the mechanisms and celerity of tumor dissemination. *Rom J Morphol Embryol.* 2024 Jan-Mar;65(1):45-52. doi: 10.47162/RJME.65.1.06. PMID: 38527983; PMCID: PMC11146457.
22. Tarhini AA, Lin Y, Yeku O, LaFramboise WA, Ashraf M, Sander C, Lee S, Kirkwood JM. A four-marker signature of TNF-RII, TGF- α , TIMP-1 and CRP is prognostic of worse survival in high-risk surgically resected melanoma. *J Transl Med.* 2014 Jan 23;12:19. doi: 10.1186/1479-5876-12-19. PMID: 24457057; PMCID: PMC3909384.
23. Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A, Onisto M, Santi L, Stetler-Stevenson WG, Albin A. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer.* 1998 Jan 19;75(2):246-53. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19980119)75:2<246::aid-ijc13>3.0.co;2-b. Erratum in: *Int J Cancer* 1999 Jan 29;80(3):485. PMID: 9462715.
24. Das AM, Bolkestein M, van der Klok T, Oude Ophuis CM, Vermeulen CE, Rens JA, Dinjens WN, Atmodimedjo PN, Verhoef C, Koljenović S, Smits R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3) expression decreases

during melanoma progression and inhibits melanoma cell migration. Eur J Cancer. 2016 Oct;66:34-46. doi: 10.1016/j.ejca.2016.06.020. Epub 2016 Aug 11. PMID: 2752224

25. Baker AH, Edwards DR and Murphy G: Metalloproteinase inhibitors: Biological actions and therapeutic opportunities. J Cell Sci 115: 3719-3727, 2002.

26. Kovatsi L, Batzios S, Nikolaou K, Fragou D, Njau S, Tsatsakis A, Karakiulakis G and Papakonstantinou E: Alterations in serum MMP and TIMP concentrations following chronic heroin abuse. Toxicol Mech Methods 23: 377-381, 2013.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

➤ Nedelcu, R. I., Ion, D. A., Holeab, C. A., **Cioplea, M. D.**, Brinzea, A., & Zurac, S. A. (2015). Dendritic cells in melanoma-immunohistochemical study and research trends. Rom J Morphol Embryol, 56(3), 997-1002. - lucrare publicată în revista Romanian Journal of Internal Medicine, indexată PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25509565/>

➤ **Cioplea M**, Nichita L, Georgescu D, Sticlaru L, Cioroianu A, Nedelcu R, Turcu G, Rauta A, Mogodici C, Zurac S, Popp C. FOXP3 in Melanoma with Regression: Between Tumoral Expression and Regulatory T Cell Upregulation. J Immunol Res. 2020 Oct 23;2020:5416843. doi: 10.1155/2020/5416843. PMID: 33274240; PMCID: PMC7683174.
factor de impact 4,4
<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/1607>