

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ
DEPARTAMENTUL X CHIRURGIE II**

ZSOLT GYORI



TEZĂ DE DOCTORAT
STUDII EXPERIMENTALE ȘI CLINICE ASUPRA
MELANOMULUI MALIGN

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. TIBERIU BRATU

REZUMAT

Timișoara
2020

CUPRINS

Lista lucrărilor publicate	VII
Lista abrevierilor	VIII
Indexul Figurilor.....	X
Indexul Tabelelor.....	XVI
Mulțumiri.....	XVII
INTRODUCERE	XVIII
PARTEA GENERALĂ	1
I. DETECTAREA ȘI DIAGNOSTICAREA FORMAȚIUNILOR TUMORALE ALE PIELII.....	1
I.1 Generalități.....	1
I.1.1 Detectarea și diagnosticarea cancerului de piele.....	2
I.1.2 Tehnicile și metodele curente	4
I.1.2.1 Fotografiera	4
I.1.2.2 Dermatoscopia	7
I.1.2.3 Ecografia	10
I.1.2.4 Microscopia confocală.....	13
I.1.2.5 Spectroscopia Raman	16
I.1.2.6 Spectroscopia cu fluorescență	18
II. FACTORII DE RISC ȘI BIOMARKERII ÎN CANCERELE DE PIELE	22
II.1 Introducere	22
II.1.1 Factorii de risc.....	22
II.1.1.1 Evaluarea expunerii la radiațiile UV	25
II.1.1.2 Biomarkeri pentru a evalua pacienți cu risc crescut	28

PARTEA SPECIALĂ	30
II.1 ROLUL LINIILOR CELULARE DE MELANOM ÎN OBȚINEREA DE TERAPII PENTRU COMBATerea PATOLOGIEI MALIGNe A ORGANULUI CUTANAT	30
II.1.1 Introducere	30
II.1.2 Materiale și metode	31
II.1.3 Rezultate și discuții.....	32
II.2 MELANINA ȘI COMPORTAMENTUL LINIILOR CELULARE MELANOMICE ÎN PREZENȚA RADIAȚIILOR ULTRAVIOLETE DE TIP B	43
II.2.1 Introducere	43
II.2.2 Materiale și metode	48
II.2.2.1 Reactivi și celule.....	48
II.2.2.2 Determinarea conținutului de melanină din mediul extracelular	49
II.2.2.3 Iradierea celulelor și studiul viabilității celulare.....	49
II.2.3 Rezultate și discuții.....	50
II.2.3.1 Determinarea conținutului de melanină.....	50
II.2.3.2 Morfologia celulară	60
II.3 CONTRIBUȚII LEGATE DE INCIDENȚA FORMAȚIUNILOR TUMORALE ALE PIELII	72
II.3.1 Introducere	72
II.3.2 Materiale și metode	73
II.3.3 Rezultate și discuții.....	74
CONCLUZII	89
BIBLIOGRAFIA	92
ANEXE	I

Cuvinte cheie: melanom, linii celulare, radiații ultraviolete de tip B

TEZA DE DOCTORAT

**STUDII EXPERIMENTALE ȘI CLINICE ASUPRA
MELANOMULUI MALIGN**

Rezumat

Melanomul este una dintre cele mai imprezibile tumori, atât în ceea ce privește morfologia, cât și evoluția bolii. Poate avea forme clinice diferite, ceea ce face foarte dificilă diagnosticarea. În ciuda numeroaselor încercări, nu a fost elaborat un tratament eficient în special pentru pacienții aflați în stadii avansate, iar detectarea precoce și îndepărtarea unei leziuni a pielii constituie în prezent cea mai eficientă metodă de tratament.

Lucrarea este structurată ținând cont de normele de redactare instituționale. Partea generală tratează: (a) detectarea și diagnosticarea formațiunilor tumorale ale pielii - detectarea și diagnosticarea cancerului de piele și tehnicile și metodele curente (fotografierea, dermatoscopia, ecografia, microscopia confocală, spectroscopia Raman și spectroscopia cu fluorescență) și (b) factorii de risc și biomarkerii în cancerule de piele. Partea specială cuprinde trei capitole principale, și anume: rolul liniilor celulare de melanom în obținerea de terapii pentru combaterea patologiei maligne a organului cutanat, melanina și comportamentul liniilor celulare melanomice în prezența radiațiilor ultraviolete de tip B și contribuții legate de incidența formațiunilor tumorale ale pielii.

Lucrarea de față conține trei obiective științifice, și anume: (i) studierea celulelor melanomice murine și umane, cu precădere cele care conțin melanină, pentru a evalua rolul acestora din prezent în abordarea melanomului, (ii) comportamentul celulelor melanomice în prezența radiațiilor ultraviolete de tip B și cuantificarea melaninei și (iii) analiza incidenței formațiunilor tumorale ale pielii într-o populație dată din zona de vest a țării în vederea stabilirii incidenței actuale a acestei maladii.

În lucrarea de față sunt prezentate studii *in vitro* pe celule 2D legate de cuantificarea celulelor viabile în anumite contexte, de morfologia celulară în

prezența factorilor perturbatori (radiații ultraviolete, melanină) și totodată sunt analizate tipurile de leziuni tumorale la pacienții care s-au prezentat la clinică, din toate grupele de vârstă, într-o anumită perioadă.

Detectarea și diagnosticarea cancerului de piele reprezintă o provocare pentru specialiștii din domeniu, care de cele mai multe ori necesită lucrul în echipă prin cooptarea specialiștilor din mai multe domenii medicale și nu numai. Cele mai utilizate principii legate de detectarea și diagnosticarea leziunilor maligne ale pielii sunt prezentate în lucrare (Principiile și mecanismele implicate optic; pe baza fotodinamicii; Ecografia; Bio-impedanță electrică; Imagine termică).

În studiul curent au fost selectate șase linii celulare de melanom diferite, atât de origine murină cât și umană, și anume: melanom de șoarece B16-F0 (ATCC® CRL-6322™), melanom de șoarece B16-F10 (ATCC® CRL-6475™), melanom de șoarece B164A5 (ECACC 94042254), melanom uman SK-MEL-5 (ATCC® HTB70™), melanom uman SK-MEL-28 (ATCC® HTB72™) și melanom uman SH-4 (ATCC® CRL-7724™) achiziționate de la Colecția europeană de culturi celulare autentificate (ECACC) și American Type Culture Collection (ATCC) ca flacoane congelate.

Pentru protocoalele de cultivare a celulelor au fost necesari următorii reactivi specifici: medii specifice - Dulbecco's Modified Eagle's Medium pentru B16-F0, B16-F10, B164A5 și SH-4, și Eagle's Minimal Essential Medium pentru SK-MEL-5 și SK-MEL-28, suplimente: ser bovin fetal (FCS) la o concentrație finală de 10%, un amestec de soluție de antibiotice (penicilină + streptomycină - concentrație finală -1%), și alți reactivi ca: soluție tripsină / EDTA și tampon salin fosfat - PBS. Mediile de cultură, suplimentele și reactivii au fost achiziționate de la ATCC, Sigma Aldrich (Germania) și Thermo Fisher Scientific (SUA). Toate procedurile au fost realizate în condiții standard, celulele au fost păstrate la 37°C, 5% CO₂ și au fost menținute în cultură pentru a urmări evoluția macroscopică sau contaminarea microbiană.

Modelele *in vitro* ale melanomului sunt reprezentate de aproximativ 5,000 de linii celulare generate, dar numai pentru peste 200 de linii celulare există un profil genetic și o caracterizare biologică. Pe lângă rolul major jucat de liniile celulare în cercetarea cancerului, au fost descrise, de asemenea, mai multe limitări, cum ar fi: 1) pierderea populațiilor stromale, vasculare și imune celulare ceea ce duce la un comportament diferit în cultură în comparație cu condițiile *in vivo*; 2) o posibilă selecție a unui subset de clone care respectă condițiile de creștere a culturii și 3) lipsa micromediului existent *in vivo* și absența interacțiunilor, fiind astfel dificil sau chiar imposibil de recreat aceste procese care se întâlnesc *in vivo*.

Acest studiu își propune să evidențieze diferențele dintre mai multe linii de celule de melanom murin și uman, care sunt frecvent utilizate ca modele pentru studii de melanom în literatura de specialitate.

În experimentul care a presupus studiul celulelor în prezența radiațiilor UVB au fost utilizate: o linie celulară sănătoasă și două linii de celule tumorale, achiziționate sub formă de produse congelate de la ATCC. Linia celulară sănătoasă a fost reprezentată de melanocitele epidermice umane primare (HEMa - ATCC® PCS-200 013™), iar liniile celulare tumorale au fost de melanoame umane (SK-MEL-3 - ATCC® HTB-69™ și COLO-829 - ATCC® CRL -1974™). Mediile adecvate necesare pentru cultivarea celulelor - Dermal Cell Basal Medium, Adult Melanocyte Growth Kit, McCoy's 5a Modified Modified și RPMI-1640 Medium au fost achiziționate de la ATCC în timp ce, toți ceilalți reactivi, cum ar fi: ser fetal bovin (FBS), penicilină / streptomicină amestec, soluția de tampon fosfat salin (PBS), combinația tripsină / EDTA și Trypan blue au fost obținute de la Sigma Aldrich (Germania). HEMA - melanocitele primare au fost înmulțite într-un mediu bazal de celule dermice, în care s-a adăugat un kit de creștere a melanocitelor adulte, 100 U / mL penicilină și 100 g / mL streptomicină amestec; SK-MEL-3 au fost cultivate în mediu modificat McCoy 5a, completat cu ser bovin fetal la o concentrație finală de 15% și COLO-829 au fost cultivate în mediu RPMI 1640, completat cu ser bovin fetal la o concentrație

finală de 10%. În timpul cultivării, toate celulele au fost păstrate în condiții optime pentru propagare - atmosferă umidificată cu 5% CO₂ la 37°C și divizate la fiecare 48 de ore. Celulele au fost numărate cu un dispozitiv de contorizare de celule automatizat, Countess II FL, în prezența reactivului Trypan blue.

Pentru a determina conținutul de melanină din mediu din probele testate a fost necesară obținerea curbelor standard pentru melanină în medii de cultură diferite specifice fiecărei linii celulare.

Protocolul de iradiere UVB, a presupus utilizarea celulelor la o confluență de min. 80–85% și etapele principale au fost: îndepărtarea mediului înainte de expunerea la UVB, spălarea cu PBS, expunerea la 312 nm, la două doze diferite - 30 mJ / cm² și 60 mJ / cm² cu un sistem Biospectra (Vilber Lourmat, Franța).

Viabilitatea celulelor a fost evaluată prin testul Alamar blue: 10,000 celule / 200 μL mediu / godeu au fost însămânțate într-o placă cu 96 de godeuri, incubate timp de 24 de ore după expunerea la UVB și analizate spectrofotometric la lungimi de undă de 570 nm și 600 nm cu un spectrofotometru xMark™ Microplate (BioRad) așa cum s-a descris anterior.

Legate de incidența formațiunilor tumorale ale pielii s-a realizat un studiu analitic, observațional, retrospectiv al cazurilor de formațiuni tumorale în județul Timiș, situat în zona de vest a României. Pacienții s-au prezentat în perioada august 2015-septembrie 2019. În cadrul Spitalului Clinic Județean de Urgență "Pius Brînzeu" Timișoara, Secția Clinică de Chirurgie Plastică Reconstructivă și Arsuri – Casa Austria. Un total de 2026 cazuri au inclus pacienți de toate vârstele. Diagnosticarea a respectat criteriile clinice, dermoscopice, histopatologice și, când a fost necesar cele imunohistochimice. Datele prelucrate au inclus caracteristicile pacienților de tip sex, vârstă și localizarea tumorii.

Lucrarea de față și-a atins în totalitate obiectivele propuse, și anume: (i) studierea celulelor melanomice murine și umane, cu precădere cele care conțin melanină, pentru a evalua rolul acestora din prezent în abordarea melanomului, (ii) comportamentul celulelor melanomice în prezența radiațiilor ultraviolet de tip

B și cuantificarea melaninei și (iii) analiza incidenței formațiunilor tumorale ale pielii într-o populație data din zona de vest a țării în vederea stabilirii incidenței actuale a acestei maladii. În urma studiilor experimentale și de literatură derulate, corelat cu obiectivele și metodele abordate, se desprind următoarele concluzii principale:

Celulele de tip 2D ar putea dezvolta un comportament diferit, dependent de condițiile *in vitro*, originea, tratamentele și alți factori. Pentru a obține un rezultat și o interpretare adecvată, oamenii de știință trebuie să cunoască particularități cu privire la aceste modificări. Celulele metastatice murine (B16-F10 și B16-F0) sunt comparabile cu metastazele umane precum SK-MEL-5 și SK-MEL-28. Progresul semnificativ și rapid al tehnologiei *in vitro* este extrem de util în elucidarea mecanismelor cheie care au loc în evoluția melanomului. Datele furnizate de comportamentul diferitelor linii celulare de melanom reprezintă un punct cheie în găsirea de noi candidați pentru încetinirea progresiei melanomului, reducerea efectelor adverse ale terapiilor actuale și creșterea speranței de viață a pacienților diagnosticați cu această boală teribilă.

Celulele de tip 2D studiate în vederea stabilirii conținutului de melanină se prezintă în felul următor: A375, SK-MEL-28 și SK-MEL-5 nu produc melanină, SK-MEL-1 – este o linie celulară de melanom uman care produce melanină, COLO 829 – la pasaje mici produce melanină, SH-4 – sunt celule care produc melanină, SK-MEL-3 – produc melanină. Dintre cele 3 linii de melanom de șoarece verificate, cea care produce melanină într-o concentrație mai mare este B16F10, fiind urmată de B16F0 și B164A5. După cum se poate observa și în cazul liniei B16F0, cu cât timpul în cultură se prelungeste și crește numărul pasajelor, cu atât scade concentrația de melanină. În ceea ce privește liniile celulare sănătoase de origine umană, melanina a fost detectată în melanocitele umane, în timp ce în cazul keratinocitelor și fibroblastelor nu a fost înregistrat conținut de melanină.

Melanocitele și celulele SK-MEL-3 au un conținut similar de melanină, în timp ce celulele COLO-829 au un conținut mai mare de melanină. În studiile

viitoare, se va evalua efectul radiațiilor de tip A și de tip B asupra celulelor din acest studiu. Tratamentul cu radiații UV de tip B a avut cel mai dăunător efect asupra celulelor COLO-829. Imediat după expunere, celulele au apărut afectate în mod semnificativ după ambele doze (30 și 60 mJ / cm²), dar după 24h celulele tratate cu doza de 30 mJ / cm² au început să-și recapete aspectul morfologic specific. Nu se poate spune același lucru pentru celulele expuse la o doză de 60 mJ / cm², caz în care peste 90% dintre celule au aspect apoptotic, celulele nefiind atașate pe placa de cultură.

La scurt timp după expunerea la UVB, la două doze diferite de radiații, melanocitele sunt afectate, dar după 24 de ore sunt recuperate complet. În cazul celulelor melanomului uman, radiațiile UVB sunt extrem de toxice pentru celulele producătoare de melanină, și anume, COLO-829, într-o manieră mult mai mare decât cele care nu produc melanină în cultură - SK-MEL-3 - dar au capacitatea de a produce tumori pigmentate în modele animale.

Studiul referitor la incidența formațiunilor tumorale într-o populație dată a relevat următoarele: persoanele cu vârste cuprinse între 60-69 ani au fost cele mai numeroase (~22%), urmate de cele din categoria de vârstă 70-79 ani (~18%), în timp ce cele sub 10 ani au reprezentat un procent sun 0.5%; din numărul total de pacienți incluși în baza de date, un procent de 2.6% au avut diagnostic de melanom, 6.5% au avut un diagnostic de carcinom bazocelular, în timp de un procent semnificativ mai mic, 0.25% au fost diagnosticați cu carcinom scuamocelular. Diagnosticarea melanomului malign în stadiile incipiente este esențială pentru creșterea speranței de viață iar autoexaminările cutanate, în special la bărbații în vârstă (ținând cont că bărbații sunt mai predispuși la dezvoltarea bolii), se pot dovedi a avea o valoare deosebită.

Opinia specialiștilor este că melanomul poate fi tratabil iar diagnosticarea corectă și precoce este critică. Este necesară o acțiune de conștientizare a problemei și personalul medical ar trebui să pledeze pentru programe dedicate populației din grupele de risc.